

Aus dem Pathologischen Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Mikrofluorometrische Untersuchungen zum Einfluß des Hydrocortisonacetat auf Rattenleber-Zellkerne

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Klaus-Dieter Böhm
aus Meisenheim

Mainz 1974

**Aus dem Pathologischen Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz**

**Mikrofluorometrische Untersuchungen
zum Einfluß des Hydrocortisonacetat
auf Rattenleber-Zellkerne**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen**

**vorgelegt von
Klaus-Dieter Böhm
aus Meisenheim**

Mainz 1974



Fachbereichsdekan: Professor Dr. R. WOLF

Referent: Professor Dr. J. LÖHR

Korreferent: Professor Dr. W. E. G. MÜLLER

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	4
III. Ergebnisse	15
IV. Diskussion	36
V. Zusammenfassung	46
VI. Literaturverzeichnis	47
Lebenslauf	61



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554426_0072

I. Einleitung

Viele physiologischen Funktionen einer Zelle im Organismus unterliegen der hormonellen Kontrolle. Die bisher gewonnenen Ergebnisse lassen erkennen, daß Hormone als "Signalgeber biologischer Regelsysteme" (KÜHNAU, 1971) direkt oder indirekt die Proteinbiosynthese der Zelle beeinflussen. Die meisten Hormone greifen dabei in die Transcriptions- und Translationsprozesse der genetischen Information ein. Die Wechselwirkungen zwischen Hormon und Zelle werden durch zwei unterschiedliche Mechanismen gesteuert:

(1) Die Nicht-Steroid-Hormone (Proteine, Peptide, Biogene Amine) reagieren nach dem einheitlichen Prinzip, das als "second-messenger-Konzept" (SCHULTZ, 1972) bekannt ist. Das Hormon als extrazellulärer "first-messenger" verbindet sich an der Zellmembran mit einem makromolekularen spezifischen Hormonrezeptor-Komplex, der mit dem Enzym Adenyl-Cyclase in enger räumlicher und funktioneller Beziehung steht. Durch die Wechselwirkung des Hormons mit dem Komplex und möglicher zwischengeschalteter, jedoch noch weitgehend unbekannter Reaktionen kommt es zu einer Aktivitätssteigerung des Enzyms. Es katalysiert die Bildung von Adenosin- 3': 5'- monophosphat (cAMP). Dieses Nukleotid als intracellulärer "second-messenger" stimuliert seinerseits cytoplasmatische und nukleäre Protein-kinasen, durch welche stoffwechselwichtige Proteine phosphoryliert werden. Zu diesen gehören unter anderem Histone und Protamine (KÜHNAU, 1971). Die Änderung der biologischen Aktivität setzt damit die für das Hormon typischen metabolischen Prozesse in Gang. Die Zellfunktion ändert sich schon nach kurzer Zeit, erreicht schnell ein Maximum und klingt rasch wieder ab.

(2) Dieser Hormongruppe stehen die Steroidhormone (Corticosteroide, Östrogene, Androgene) gegenüber. Besonders gut ist die Wirkung und der Stoffwechsel der Nebennierenrindenhormone in der Leber erforscht (FIALA u. LITWACK, 1966; MOREY u. LITWACK, 1969; LOWY et al., 1969). Während das Cortison auf den Gesamtorganismus eine proteinkatabole Wirkung hat (Wachstumsstop, Sinken des Körpergewichtes), zeigt sich an der Leber ein anaboler Effekt (Protein- und Glycogengehalt nehmen zu, Lebergewicht steigt an) (CLARK u. PESCH, 1956; GOODLAD u. MUNRO, 1959; JERVELL, 1963; LOWE u. RAND, 1956).

Im Blut wird Cortisol größtenteils an das Serum-Globulin "Transcortin" (=CBG - Corticoid-Binding-Globulin) gebunden (LOWY et al., 1969; WESTPHAL, 1971) und bildet wahrscheinlich einen extrazellulären Hormonpool. Über den transmembranösen Transport dieses Hormons sowie den cytoplasmatischen und nukleären Rezeptor gibt es nur wenige Angaben, die auf in-vitro- oder in-vivo Versuchen (BAXTER u. TOMKINS, 1971; BAXTER et al., 1972; BEATO et al., 1969 a+b, 1970, 1971, 1972; MOREY u. LITWACK, 1969) basieren.

1961 wurde von KARLSON erstmals die Vermutung geäußert, daß die Steroidhormone primär im Zellkern auf der Stufe der Transcription in die Biosynthese "programmierter" Proteine eingreifen. Obwohl die direkten oder indirekten Wechselwirkungen der Corticosteroide mit dem Nukleoproteid-Komplex (DNP) gesichert erscheinen, sind die einzelnen Schritte zur Änderung der Matrizenaktivität der Desoxyribonukleinsäure (DNA) in vivo noch weitgehend ungeklärt.

Die quantitative und qualitative Cytophotometrie kann zur Klärung dieses Problems einen Beitrag leisten. Die Methode kann mittels spezifischer histochemischer

Reaktionen eine Aussage über den "Normalzustand" und die biochemischen Reaktionen genetisch aktivierbarer Loci des Chromatins nach hormoneller Stimulation machen (LÖHR, 1973; MÜLLER, 1966; RIGLER, 1966; RIGLER et al., 1969).

Die vorliegende Arbeit soll versuchen, das Wirkungsprinzip des Hydrocortisonacetats auf chromosomaler Ebene am DNP-Komplex zu beleuchten.

Dabei soll folgende Frage beantwortet werden:

Welche Veränderungen der Farbstoffbindungskapazität treten unter Hydrocortisonacetatstimulierung am Chromatin bei verschieden hoher Dosierung während eines Zeitraumes von 8 Tagen auf?

II. Material und Methoden

1. Material

Untersucht wurden diploide Interphase-Leberzellkerne von insgesamt 50 einjährigen, weiblichen Albino-WISTAR Ratten, die der eigenen standardisierten Nachzucht entstammten. Das durchschnittliche Körpergewicht der Tiere betrug bei Versuchsbeginn 270 - 320 g (siehe Tabelle 1). Futter (ALTROMIN) und Wasser standen den Tieren ad libitum zur Verfügung. Die 50 Tiere wurden in 5 Gruppen aufgeteilt. Jede Gruppe setzte sich aus 10 Tieren zusammen. Davon wurden

4 Ratten mit 5 mg Hydrocortisonacetat/200 g
Körpergewicht/die

und 4 Ratten mit 25 mg Hydrocortisonacetat/200 g
Körpergewicht/die behandelt.

2 Ratten wurden als Kontrollen unbehandelt ge-
lassen.

Die Applikationsdauer betrug für:

Gruppe 1	-	1 Tag,
Gruppe 2	-	2 Tage,
Gruppe 3	-	4 Tage,
Gruppe 4	-	6 Tage und
Gruppe 5	-	8 Tage.

Die tägliche Dosierung wurde den Tieren morgens nach vorheriger Bestimmung des Körpergewichtes als intramuskuläre Injektion gespritzt.

Die Tiere wurden 5 Stunden nach der letzten Injektion von Hydrocortisonacetat durch Dekapitation getötet und ausgeblutet.

Aus methodischen Gründen wurden die Tiere in Färbeserien zusammengefaßt. Jede Serie umfaßte 2 Tiere einer Gruppe, wobei ein Tier aus dem Versuchsansatz mit 5 mg Hydrocortisonacetat und eins aus der 25 mg Dosierung stammte. Desweiteren liefen 3 Kontrolltiere bei den Serien I und III und 2 Kontrollen bei den Serien II und IV mit.

Nach Eröffnung des Bauchraumes wurde die Leber in toto präpariert und deren Frischgewicht ermittelt (Tabelle 1). Dem linken ventralen Leberunterlappen wurde ein Gewebestück entnommen und zwischen zwei geschliffenen Gläsern fein zerquetscht. Von jedem Tier wurden 10 dünne Ausstrichpräparate auf gereinigten Objektträgern mit zu vernachlässigender Eigenfluoreszenz (Fa. O. KINDLER, Freiburg/Westdeutschland) angefertigt.

Nach einer Stunde Lufttrocknung bei einer Raumtemperatur von $+20^{\circ}\text{C}$ wurden die Präparate für die Feulgen-Nucleal-Reaktion und die Fastgreen-Färbung 60 min. in 96 %-igem Alkohol fixiert und anschließend über Silikagel in luftdicht verschlossene Glasküvetten gestellt. Bis zur Färbung wurden sie im Gefrierschrank bei -6°C aufbewahrt.

Die Präparate für die Acridinorange-Färbung wurden nach der Lufttrocknung direkt über Silikagel unter den gleichen Bedingungen gelagert. Die Dauer der Aufbewahrung betrug maximal 4 Tage.

Die Ausstrichpräparate für die Phenanthrenchinon-Färbung wurden in neutralem, 10 %-igem, gepuffertem Formol bei $+2^{\circ}\text{C}$ im Eisschrank für 5 - 24 Stunden fixiert. Der Emissionsverlust kann in diesem Zeitraum und bei dieser Temperatur nach LÖHR und HEIMER (1972) vernachlässigt werden. Die gesamte injizierte Hydrocortisonmenge wurde bei jedem Tier bestimmt und in Tabelle 1, Spalte 4 wiedergegeben.

2. Färbung

Histochemische Färbung der Ausstrichpräparate:

- A Phenanthrenchinon-Färbung zum Arginin-Nachweis
(nach MAGUN u. KELLY, 1969)
- B Acridinorange-Färbung, pH 4,1, nach Acetylierung, zur
Darstellung "freier DNA-PO₄"-Gruppen (nach RIGLER, 1966)
 - a. mit "gereinigtem" Acridinorange
 - b. mit ungereinigtem Acridinorange
- C Feulgen-Nucleal-Reaktion zum Nachweis des nukleären
DNA-Gehaltes (nach MÜLLER, 1966)
- D Fastgreen-FCF-Reaktion zur Bestimmung nukleärer basi-
scher Proteine (nach ALFERT u. GESCHWIND, 1953 und
NOESKE, 1968)

zu A Phenanthrenchinon-Färbung (nach MAGUN u. KELLY, 1969)

- 1. Fixation in 10 %-igem neutral-gepuffertem Formalin :
24 Stunden
- 2. Schnitte unter fließendem Leitungswasser in einer
Glasküvette waschen : 60 min
- 3. Äthanol 70 %-ig : 5 min.
- 4. Äthanol 100 %-ig : 5 min.
- 5. Xylol : 5 min.
- 6. Äthanol 100 %-ig : 3 x je 1 min.
- 7. Färbung mit Phenanthrenchinon : 10 min.
- 8. Äthanol 100 %-ig : 3 x je 1 min.
- 9. Äthanol 70 %-ig : 5 min.
- 10. Äthanol 30 %-ig : 5 min.
- 11. Aqua dest. : 5 min.

Eindecken der gefärbten Präparate mit frisch zubereiteter Lösung aus 9 Teilen Glycerin (Fa. E. MERCK Nr. 4095) und 2 Teilen 5n NaOH. Abdecken mit Deckgläsern der Größe 24 x 60 mm. Umrandung der Präparate mit Nagellack, um eine Austrocknung der Ausstriche und das Auslaufen der Eindecklösung zu verhindern.

Die Phenanthrenchinon-Färbelösung wurde für jede Präparateserie neu angesetzt aus 2ml 5n NaOH, 18 ml Aqua dest., 80 ml Äthanol 100 %-ig, 20 ml N-Dimethylformamid (Fa. E. MERCK Nr. 2937) und 200 mg Phenanthrenchinon (Fa. SCHUCHARDT, München, Nr. 34055).

zu B Acridinorange-Färbung, pH 4,1, nach Acetylierung
(nach RIGLER, 1966)

1. Pyridin wasserfrei
(Fa. E. MERCK Nr. 7461) : 5 min.
2. Pyridin wasserfrei: Essigsäureanhydrid
(Fa. E. MERCK Nr. 42) im Verhältnis 3 : 2: 15 min.
3. Äthanol 100 %-ig : 5 min.
4. Äthanol 96 %-ig : 5 min.
5. Äthanol 60 %-ig : 5 min.
6. Äthanol 30 %-ig : 5 min.
7. Aqua bidest. : 3 min.
8. McILVAINE-Puffer, pH 4,1 : 5 min.
9. McILVAINE-Puffer, pH 4,1, mit 10^{-4} M
Acridinorange : 15 min.
10. McILVAINE-Puffer, pH 4,1, 3 x je 5 min.

Eindecken der Präparate mit McILVAINE-Puffer, pH 4,1, und Deckgläsern der Größe 24 x 50 mm. Umrandung mit Nagellack.

Eine für den gesamten Versuchsansatz ausreichende Menge einer Stammlösung von McILVAINE-Puffer, pH 4,1, wurde aus 0,1 m Zitronensäure und 0,2 m Na_2HPO_4 hergestellt. Das Acridinorange-Reagenz wurde von der Fa. E. MERCK, Darmstadt/Westdeutschland bezogen. Die Stammlösung für ungereinigtes Acridinorange wurde in 10^{-1} m flüssiger Form im Eisschrank bei einer Temperatur von $+2^\circ\text{C}$ aufbewahrt, die Stammlösung für "gereinigtes" Acridinorange als 1 m eingefrorene Lösung im Tiefkühlschrank bei -20°C gelagert. Für eine Färbeserie wurde der Farbstoff im Physiologisch-Chemischen Institut der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (Direktor: Prof. Dr. R. ZAHN) zusätzlich wie folgt gereinigt:

1. Lösen von 0,5 g Acridinorange in Äthanol
2. Abfiltrieren durch doppeltes Faltenpapier
3. Verdünnung mit 10 ml Aqua dest.
4. Zugabe von 1 N NaOH bis gelbe Farbbase ausfällt
5. Abfiltrieren durch doppeltes Faltenpapier und Abtrocknen im Vakuum
6. Farbbasen in 20 ml CHCl_3 lösen
7. Diese 20 ml auf Al_2O_3 -Säule auftragen und mit CHCl_3 eluieren (Acridinorange kommt als erste Bande durch)
8. Farbphase auf Rotationsverdampfer einengen, Kristallisation
9. Kristalle an der Ölpumpe trocknen (Vakuum)

zu C Feulgen-Nukleal-Reaktion (nach MÜLLER, 1966)

- | | |
|--|---------|
| 1. Nachfixierung in 95 %-igem Äthanol : | 60 min. |
| 2. Hydrolyse der Präparate in 1n HCl bei
+ 60°C : | 12 min. |
| 3. SCHIFF'sches Reagenz : | 60 min. |

- | | | |
|--|--------|---------|
| 4. SO_2 - Wasser : | 3 x je | 10 min. |
| 5. Äthanol 30 %-ig, 60 %-ig, 70 %-ig,
96 %-ig : | je | 3 min. |
| 6. Xylol : | | 5 min. |

Eindecken der Präparate mit Eukitt und Deckgläsern der Größe 24 x 50 mm.

Das zur Feulgen-Reaktion notwendige SCHIFF'sche Reagenz wurde nach den Bedingungen von GRAUMANN (1953) für alle Versuchsansätze gemeinsam hergestellt: Lösen von 0,5 g Pararosanilin (Fa. E. MERCK, Nr. 7601) in 15 ml in HCl und Zugabe von 0,5 g Kaliummetabisulfit, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$, (Fa. MERCK, Nr. 5057), gelöst in 85 ml Aqua dest.. Aufbewahrung im Dunkeln, nach 24 Stunden Filtrierung über Aktivkohle.

Die Herstellung des SO_2 -Wassers erfolgte aus 12 ml 10 %-iger $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ -Lösung, 10 ml in HCl und Auffüllen auf 200 ml mit Aqua dest.

zu D Fastgreen-Färbung (nach ALFERT u. GESCHWIND, 1953 und NOESKE, 1968)

- | | |
|--|----------|
| 1. Nachfixierung in 10 %-igem neutralem gepuffertem Formalin : | 60 min. |
| 2. Präparate unter fließendem Wasser waschen: | 120 min. |
| 3. Hydrolyse in 5 %-iger Trichloressigsäure bei + 90°C : | 15 min. |
| 4. Äthanol 70 %-ig : 2 x je | 10 min. |
| 5. Aqua dest., pH 8,1 : | 10 min. |
| 6. Färbung in 0,1 %-iger wässriger Fastgreen-lösung, pH 8,1 : | 30 min. |

- | | |
|-------------------------------|--------|
| 7. Aqua dest. pH 8,1 : 3 x je | 1 min. |
| 8. Aqua dest. pH 6,5 : 2 x je | 1 min. |
| 9. Äthanol 100 %-ig: | 1 min. |
| 10. Xylol: | 1 min. |

Eindecken mit Eukitt ($n = 1,495$) unter Deckgläsern der Größe 24 x 50 mm.

Herstellung einer Fastgreen-Stamm-Lösung 0,1 %-ig, pH 8,1, durch Lösen von 0,1 g Fastgreen FCF (Fa. CHROMA, Stuttgart-Untertürkheim, Nr. 10720) in 100 ml Aqua dest. pH 8,1.

Einstellen des Aqua dest. pH 8,1 mit 0,1 n NaOH, des Aqua dest. pH 6,5 mit 0,1 n HCl.

3. Mikrofluorometrische Messungen

Die Fluoreszenzemissionsmessungen wurden mit einem Mikroskop-Photometer mit variabler Meßblende (MPV-I) vorgenommen (Fa. E. LEITZ, Westzlar, W.-Deutschland).

Aufbau im wesentlichen nach BÖHM und SPRENGER (1968).

Durchlicht zur Objekteinstellung:

Phasenkontrasteinrichtung mit Kondensor nach HEINE (1931). Ölimmersionsobjektiv PvFL 70 x mit N.A. 1,15. Niedervoltlampe 5 Volt. Die Ausbleichung wurde durch Vorschalten eines Interferenzdoppelbandfilters 618 ± 19 nm (Fa. SCHOTT u. Gen., Mainz/Westdeutschland) niedrig gehalten. Ausbleichkurven dazu wurden von DENKHAUS und HEIMER (1970) und LÖHR und HEIMER (1972) aufgestellt.

Auflicht-Fluoreszenz zur Messung:

Optische Einrichtung:

PLOEM-Opak, Phasenkontrastobjektiv PvFL 70 x

Anregung:

Xenon-Höchstdruckbrenner XBO 150 W (Fa. OSRAM, Berlin), Gleichrichtervorschaltgerät Typ VX 150f-2b-L unter Vorschaltung eines Spannungskonstanthalters, Typ EMK VX (Dominit), (beide Geräte von Fa. SIEMENS, Erlangen, Westdeutschland).

Filter:

Wärmeschutzfilter NG 1, Erregerfilter UG 1/1 mm bei Messungen der Phenanthrenchinon- und Acridinorange-Färbung, BG 12/1 mm bei Feulgen-Reaktion und Fastgreen-Färbung. Sperrfilter: Interferenzbandverlaufsfilter Typ Veril A, Subtyp B-60 (alle Filter von Fa. SCHOTT, Mainz).

Messung der Fluoreszenzemission der Phenanthrenchinon-Färbung bei 470 nm, Acridinorange-Färbung bei 510 nm, Feulgen-Nucleal-Reaktion bei 550 nm, Fastgreen-FCF-Reaktion bei 610 nm.

Meßeinrichtung:

S-20 Photokathode Typ 9558 A (Fa. EMI, Gr.-Britannien).
Spannungsverteiler Typ SKV/K-BN 345 A, hochstabilisiertes
Netzgerät Typ NSHM-BN 600 S/N 481 : beide Geräte zusammengefaßt in der Lichtmeßeinrichtung Typ MPLK-BN 5007 (Fa. KNOTT-Elektronik, München/Westdeutschland).

Saugspannung der Photokathode bei Phenanthrenchinon- und Acridinorange-Färbung 1,2 kV, bei Feulgen- und Fastgreen-Reaktion 1,4 kV.

Leerwertmessung: Bei Phenanthrenchinon- und Acridinorange-Färbung direkt neben dem Objekt nach der gleichen Methode. Hierbei wurden mindestens 100 Zellkerne pro Ausstrichpräparat gemessen. Bei Feulgen-Nukleal- und Fastgreen-FCF-Reaktion dienten homologe Lymphozyten als Referenzsystem zu den Leberzellkernen. Es wurden dabei mindestens 50 Leberzellkerne und Lymphozyten eines Präparates ausgewertet.

Meßinstrument:

Mikroamperemeter mit einem Meßbereich zwischen 0,0018 - 20 μ A/Skalenteil (Fa. NORMA, Wien/Österreich), bei den Messungen eingestellt auf 0,002 μ A/Skalenteil.

Meßanordnung:

	Filter	Sperr- filter	Interferenz- bandverlaufs- filter	Saug- spannung
Phenanthren- chinon- Färbung	NG 1 BG 38 UG 1	SF 470	IVF 1,6	1,2 kV
Acridin- orange- Färbung	NG 1 BG 38 UG 1	SF 510	IVF 2,6	1,2 kV
Feulgen- Nucleal- Reaktion	NG 1 BG 38 BG 12	SF 570	IVF 3,3	1,4 kV
Fastgreen- FCF- Reaktion	NG 1 BG 38 BG 12	SF 610	IVF 4,3	1,4 kV

Meßvorgang:

Einstellen der Kerne in Phasenkontrast. Zentrieren der Meßblende. Ausblenden des Durchlichtes und Öffnen des Photomultipliierverschlusses. Einblenden des UV-Lichtes zur Auflicht-Fluoreszenz bis zum maximalen Galvanometer-ausschlag (ca. 1 sec.). Ausblenden des UV-Lichtes.

4. Statistische Auswertung

Mit Hilfe eines programmierten Tischrechners (Olivetti Programma 101) wurde aus der Anzahl der gemessenen Leberzellkerne und Lymphozyten eines Präparates:

1. der statistische Mittelwert $\bar{x}$,

2. die Standardabweichung s

und 3. die Standardabweichung des Mittelwertes $s_{\bar{x}}$ ermittelt.

Zusätzlich wurden zur besseren graphischen Darstellung die statistischen Mittelwerte und Standardabweichungen aller homologen Lymphozyten berechnet.

In den Verlaufskurven sind die Standardabweichungen so dargestellt, daß sie die stärksten Ausschläge der Serien I - IV am betreffenden Versuchstag wiedergeben.

Das vorliegende Programm berechnet:

1. Mittelwert $\bar{x} = (\sum_{i=1}^n x_i) / n$

2. Standardabweichung $s = \sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 / (n-1)} = \sqrt{(\sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{1}{n} (\sum_{i=1}^n x_i)^2) / (n-1)}$

3. Standardabweichung des Mittelwertes $s_{\bar{x}} = s / \sqrt{n}$

III. Ergebnisse

Bei den mit Hydrocortisonacetat behandelten Tieren zeigt sich, daß das Körpergewicht mit Anstieg der Versuchsdauer und der Gesamtmenge des injizierten Hydrocortisonacetats abnahm. Die Gewichtsabnahme zeigte sich ab der 3. Gruppe sehr deutlich: Die mit 5 mg Hydrocortisonacetat behandelten Tiere nahmen um 20 - 40 g bei einem Ausgangskörpergewicht von 300 g ab. Ebenso sank das Körpergewicht bei den Ratten, die mit 25 mg Hydrocortisonacetat/200 g Körpergewicht/die behandelt wurden, von ungefähr 300 g um 30 - 40 g. Im letzten Versuchsansatz (Applikationsdauer: 8 Tage) war das Körpergewicht von 280 - 290 g auf 230 - 250 g gesunken.

Beim Vergleich der Lebergewichte der Tiere ist dagegen kein Einfluß des Hydrocortisonacetats ersichtlich.

In der Tabelle 1 sind die laufende Tiernummer, die Dosis Hydrocortisonacetat in mg/200 g Körpergewicht/die, die Versuchsdauer, die Gesamtdosis Hydrocortisonacetat, die jedem Tier injiziert wurde, sowie das Körpergewicht vor und nach der Versuchsdauer und das Lebergewicht nach der Präparation enthalten.

Tier Nr.	Dosis HC (mg/200 KG)	Versuchsdauer (Tage)	Gesamtmenge HC (mg)	Kü-Ver-suchsbeginn (g)	Kü-Ver-suchs-ende (g)	Leber-Gewicht (g)
1	5	1	6,75	270	270	8,0
2			7,25	290	290	9,0
3			6,75	270	270	8,3
4			7,25	290	290	8,9
11		2	14,50	290	290	8,0
12			14,75	300	290	8,1
13			14,75	300	290	8,6
14			14,75	300	290	8,2
21		4	31,25	320	300	9,9
22			28,50	300	270	7,9
23			29,00	310	270	8,2
24			28,25	310	270	8,2
31		6	42,25	300	260	8,3
32			45,25	310	270	8,2
33			43,75	310	290	8,9
34			43,50	300	280	8,5
41		8	52,00	280	240	7,3
42			52,00	280	250	6,8
43			53,25	290	240	7,6
44			53,00	290	240	8,8
5	25	1	37,50	300	300	9,8
6			36,25	290	290	9,4
7			37,50	300	300	11,4
8			37,50	300	300	8,6
15		2	80,00	310	330	11,3
16			76,25	300	310	8,5
17			77,50	310	310	10,2
18			75,00	310	290	10,3
25		4	140,00	300	260	8,6
26			145,00	310	270	9,0
27			151,25	320	280	10,7
28			145,00	300	270	8,2
35		6	217,50	300	270	9,7
36			220,00	300	280	9,9
37			218,75	300	280	9,6
38			215,00	300	260	8,4
45		8	248,75	290	240	9,8
46			248,75	290	230	7,8
47			251,25	290	240	7,5
48			246,25	290	230	9,7
9	Kontrolle	1	-	300	300	11,1
10			-	300	300	9,3
19		2	-	310	320	9,6
20			-	300	320	10,0
29		4	-	300	310	9,3
30			-	300	310	9,8
39		6	-	270	280	7,6
40			-	270	280	7,6
49		8	-	270	250	6,8
50			-	270	290	7,3

Tabelle 1:

Übersichtsdarstellung des Versuchsansatzes mit Angabe der Gesamtmenge applizierten Hydrocortisonacetats für jedes Tier, des Körpergewichts bei Versuchsbeginn und -ende sowie des Leberfrischgewichtes.

Ergebnisse der Färbereaktionen

1. Phenanthrenchinon-Färbung zur Darstellung nukleärer Argininresiduen

In den Ausstrichpräparaten wurden die Fluoreszenzemissionen von mindestens 100 diploiden Leberzellkernen/Präparat gegen den Leerwert bei 470 nm gemessen. Es wurde statistisch der Mittelwert ($\bar{x}$), die Standardabweichung (s) und die Standardabweichung des Mittelwertes ($s_{\bar{x}}$) der Extinktionen ermittelt. Tabelle 2 und 3 fassen die Meßergebnisse der Serien I - IV für die Phenanthrenchinon-Färbung zusammen. In den Abbildungen 1 und 2 sind in einem Koordinatensystem (Ordinate: Einheiten der Fluoreszenzemission, 1 AE = 0,002 μ A/Skalenteil; Abszisse: Versuchsdauer in Tagen) die Verlaufskurven der Fluoreszenzemission gegen die Versuchsdauer aufgetragen.

Aus Abbildung 1 ist ersichtlich, daß am ersten Tag, schon 5 Stunden nach der intramuskulären Hormongabe, die Farbstoffbindungskapazität des Chromatins nativer Leberzellkerne von Ratten um etwa 6 Arbeitseinheiten zunimmt, was einer Steigerung um etwa 30 % entspricht. Am 2. Tag wird die maximale Emission des gesamten Versuchszeitraumes gemessen. Die Werte aller Serien liegen bei 30 AE, während sie für die Kontrollen 20 AE betragen. Dieses bedeutet eine 50 %-ige Steigerung der Fluoreszenzemission nach dem hormonellen Stimulus. Am 4. Versuchstag fällt die Kurve auf 24 - 25 Einheiten. Die Farbstoffbindungskapazität bleibt auf diesem Niveau, so daß am Versuchsende noch eine Erhöhung der Basisextinktionen um 4 - 6 Arbeitseinheiten oder 25 % gegenüber den Kontrolltieren resultiert.

Serie I	Tier-Nr.	Dosis HC (mg/200 KG)	Ver-suchsdauer (Tage)	Kern-zahl n	$\bar{x}$	S	S $\bar{x}$
PHENANTHRENCINON	1	5	1	116	26,76	1,60	0,15
	11		2	104	30,06	1,14	0,12
	21		4	111	25,23	1,09	0,11
	31		6	114	24,56	1,46	0,14
	41		8	109	24,75	1,29	0,13
	7	25	1	121	28,07	2,03	0,19
	17		2	111	30,54	1,04	0,10
	27		4	107	29,92	1,38	0,14
	37		6	110	26,87	0,92	0,09
	47		8	130	19,86	1,11	0,10
	30	K		110	20,36	1,38	0,14
	40			111	20,81	1,67	0,16
	50			119	19,98	1,44	0,14

Serie II	Tier-Nr.	Dosis HC (mg/200 KG)	Ver-suchsdauer (Tage)	Kern-zahl n	$\bar{x}$	S	S $\bar{x}$
PHENANTHRENCINON	2	5	1	112	26,62	1,73	0,17
	12		2	106	30,04	1,06	0,11
	22		4	107	25,12	1,12	0,11
	32		6	116	23,67	0,99	0,10
	42		8	112	24,48	1,09	0,11
	6	25	1	105	29,83	2,58	0,26
	16		2	113	30,99	1,00	0,10
	26		4	105	29,77	1,31	0,13
	36		6	113	26,86	0,93	0,09
	46		8	110	21,35	1,06	0,11
	9	K		134	20,37	1,70	0,15
	10			109	19,48	0,94	0,09

Tabelle 2:

Phenanthrenchinon-Färbung der Serien I und II.

$\bar{x}$ = Mittelwert der Fluoreszenzemissionen in AE
(1 AE = 0,002 μ A/Skalenteil)

S = Standardabweichung

S $\bar{x}$ = Standardabweichung des Mittelwertes

Serie III	Tier-Nr.	Dosis HC (mg/200 KG)	Ver-suchs-dauer (Tage)	Kern-zahl n	$\bar{x}$	S	S $\bar{x}$
PHENANTHRENCHINON	3	5	1	114	25,95	1,71	0,16
	13		2	111	30,15	1,09	0,10
	23		4	118	25,17	1,16	0,11
	33		6	114	24,19	0,93	0,09
	43		8	111	25,14	1,62	0,16
	8	25	1	107	29,52	2,55	0,29
	18		2	112	30,82	1,03	0,10
	28		4	113	30,07	1,06	0,10
	38		6	112	26,78	1,00	0,10
	48		8	125	21,48	1,34	0,12
	29	K		114	19,92	0,97	0,10
	39			124	20,11	1,34	0,13
	49			110	19,85	1,33	0,13
PHENANTHRENCHINON	4	5	1	110	26,55	1,84	0,18
	14		2	111	30,34	1,06	0,11
	24		4	113	24,05	0,95	0,09
	34		6	118	23,92	1,03	0,10
	44		8	112	25,63	2,04	0,20
	5	25	1	108	28,24	1,69	0,17
	15		2	103	31,17	1,10	0,11
	25		4	111	29,82	1,02	0,10
	35		6	109	27,01	1,05	0,10
	45		8	115	21,55	1,19	0,12
	10	K		115	20,08	2,97	0,25
	20			114	19,83	1,17	0,11

Tabelle 3:

Phenanthrenchinson-Färbung der Serien III und IV.

$\bar{x}$ = Mittelwert der Fluoreszenzemissionen in AE
(1 AE = 0,002/μA/Skalenteil)

S = Standardabweichung

$S_{\bar{x}}$ = Standardabweichung des Mittelwertes

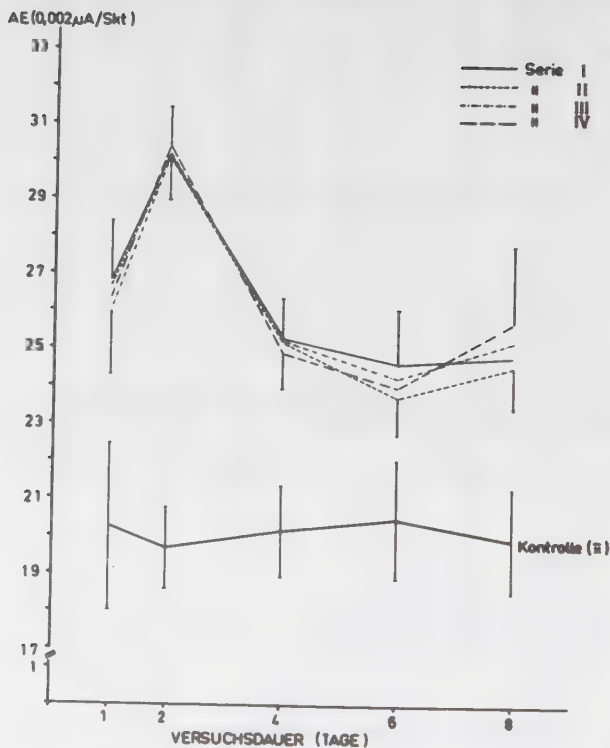


Abb. 1 :

Phenanthrenchinon-Verlaufskurven der Färbeserien I - IV nach Behandlung mit 5 mg Hydrocortison-acetat/200 g Körpergewicht/die. Dargestellt ist der Mittelwert ($\bar{x}$) mit der Standardabweichung (s). Kontrolle: Mittelwert ($\bar{x}$) mit Standardabweichung (s) der Fluoreszenzemissionen in AE zweier unbehandelter Tiere.

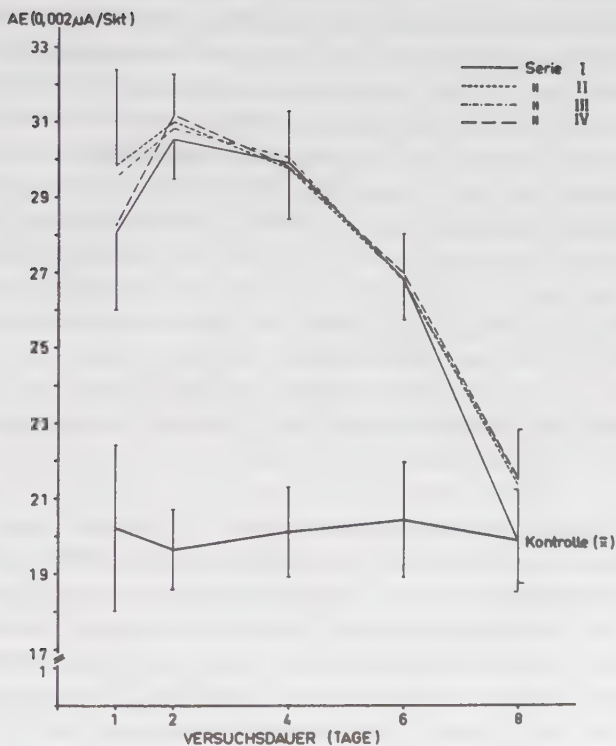


Abb. 2 :

Phenanthrenchinon-Verlaufskurven (Mittelwert $\bar{x}$ mit Standardabweichung s) der Färbereihen I - IV nach Behandlung mit 25 mg Hydrocortisonacetat/200 g Körpergewicht/die.
Die Kontrolle umfaßt jeweils 2 Tiere.

Abbildung 2 veranschaulicht den Verlauf der Fluoreszenz-emissionen der Kontrolltiere und der Färbereihen I - IV bei Dosierung mit 25 mg Hydrocortisonacetat/200 g Körpergewicht/die. Am ersten Tag erhöht sich die Fluoreszenz-emission um durchschnittlich 8,5 Arbeitseinheiten. Hier fand sich eine breite Streuung der Mittelwerte und der Standardabweichungen. Dieser Anstieg setzt sich am zweiten Tag bis auf etwa 30,8 Arbeitseinheiten gegenüber 19,7 Arbeitseinheiten der Kontrollen fort. Am 4. Tag sinkt die Farbstoffbindungskapazität um etwa eine Einheit ab. Am 6. Versuchstag werden noch 27 AE bei den hormonbehandelten Tieren registriert, die damit zu diesem Zeitpunkt noch um 6,5 Einheiten oder 32,8 % über dem Fluoreszenzemissionswert von 20,4 AE der Kontrollen liegen. Am Ende der Versuchsdauer nähern sich die Werte bis auf knapp eine Einheit denen der Kontrolltiere. Ein Präparat hatte Meßwerte, die noch niedriger waren.

Aus den beiden Versuchsansätzen ist ersichtlich, daß die Fluoreszenzemissionen bei Phenanthrenchinon-Färbung nach Hormon-Stimulierung am 1. Tag deutlich erhöht sind, am 2. Tag ein Maximum erreichen, dann im weiteren Verlauf des Versuches divergieren. Während sie bei den niedrig-dosierten Tieren an den weiteren Tagen auf einem erhöhten Niveau bleiben, sinken sie bei den hochdosierten Serien an dem 4. Tag ab und liegen am Ende nur wenig über den Emissionswerten der unbehandelten Ratten.

2. Acridinorange-Färbung zur Darstellung "freier DNA-PO₄³⁻-Gruppen im Chromatin

In den Tabellen 3 und 4 sind die aus den Meßwerten bei 510 nm errechneten Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Standardabweichungen des Mittelwertes für jedes Tier der Serie I - IV zusammengefaßt. Bei den Serien I und III wurden Simultanmessungen mit "gereinigtem" und ungereinigtem Acridinorange durchgeführt. Sie wurden zum Vergleich tabellarisch untereinanderbeschrieben (obere Zeile: "gereinigtes" Acridinorange; untere Zeile: ungereinigtes Acridinorange). Die Messungen bei Serie II und IV wurden nach Färbung mit "gereinigtem" Acridinorange gemacht.

In den Abbildungen 3 und 4 sind die errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen gegen die Versuchsdauer graphisch aufgetragen. Die Standardabweichungen der einzelnen Serien liegen innerhalb der eingetragenen Schwankungsbreite. Bei den Kontrollen wurde der Gesamtmittelwert mit Standardabweichung zweier Tiere gebildet und graphisch dargestellt. Die Abbildungen demonstrieren deutlich einen gleichartigen Kurvenverlauf wie nach Phenanthrenchinon-Färbung. Am ersten Tag liegt die Fluoreszenzemission bei den behandelten Tieren der 5 mg-Gruppe um 3 Einheiten höher als bei den Kontrollen, bei den Serien mit 25 mg um etwa 6 AE (1 AE = 0,002 μ A/Skalenteil). Dieses entspricht einer Steigerung der Farbstoffbindungskapazität von ca. 30 % bzw. 50 %.

Am 2. Tag findet sich auch hier, wie bei der Darstellung nukleärer Argininresiduen, die maximale Fluoreszenzemission aller Serien des gesamten Versuchszeitraums.

Serie I	Tier-Nr.	Dosis HC (mg/200 KG)	Ver-suchs-dauer (Tage)	Kern-zahl n	$\bar{x}$	S	S $\bar{x}$
ACHIDIN-ORANGE Färbung	1	5	1	113 167	15,09 14,28	1,03 0,87	0,10 0,07
	11		2	110 110	20,29 21,05	0,61 1,04	0,06 0,10
	21		4	104 111	15,35 15,09	0,92 0,89	0,10 0,09
	31		6	116 106	16,15 15,36	0,95 0,94	0,09 0,10
	41		8	111 108	15,77 15,81	0,75 0,93	0,08 0,09
	7	25	1	107 235	18,03 16,41	1,80 0,82	0,18 0,06
	17		2	109 109	20,78 21,30	0,88 1,09	0,08 0,11
	27		4	115 112	17,19 17,29	0,85 1,00	0,08 0,10
	37		6	111 121	15,91 15,61	0,88 0,99	0,09 0,09
	47		8	122 113	13,23 13,73	1,01 1,02	0,10 0,10
	30	K		115 205	10,43 10,29	0,86 0,79	0,08 0,06
	40			111 230	10,68 10,02	1,08 0,53	0,11 0,04
	50			114 139	11,09 10,60	0,88 0,89	0,09 0,08
ACRIDIN-ORANGE Färbung							
	2	5	1	112	15,04	0,96	0,10
	12		2	105	20,94	0,66	0,07
	22		4	111	15,64	1,07	0,11
	32		6	111	16,14	1,07	0,11
	42		8	133	15,89	0,91	0,08
	6	25	1	111	19,01	1,32	0,13
	16		2	110	20,59	1,01	0,10
	26		4	105	17,33	0,83	0,09
	36		6	111	15,92	0,97	0,10
	46		8	119	13,27	1,01	0,10
	9	K		116	11,87	1,08	0,11
	19			116	12,03	0,93	0,09

Tabelle 4:

Acridinorange-Färbung der Serien I und II.

Serie I : obere Zeile die Untersuchungsergebnisse für "gereinigtes" Acridinorange, darunterstehende Werte für ungereinigtes Acridinorange

Serie II: Färbung mit "gereinigtem" Acridinorange

$\bar{x}$ = Mittelwert der Fluoreszenzemissionen in AE

S = Standardabweichung

$S_{\bar{x}}$ = Standardabweichung des Mittelwertes

Serie III	Tier-Nr.	Dosis HC (mg/200 KG)	Ver-suchsdauer (Tage)	Kern-zahl	$\bar{x}$	s	s $\bar{x}$	
ACRIDIN - ORANGE Färbung	3	5	1	111 167	14,79 14,29	0,92 0,84	0,09 0,07	
	13		2	109 108	21,02 20,33	0,98 0,93	0,10 0,09	
	23		4	108 113	15,75 14,88	1,02 0,96	0,10 0,09	
	33		6	116 105	16,13 15,70	0,95 1,06	0,09 0,11	
	43		8	129 112	15,87 15,83	0,83 1,08	0,08 0,11	
	8	25	1	117 224	16,89 16,45	0,95 0,78	0,09 0,06	
	18		2	114 110	20,50 20,27	1,04 0,97	0,10 0,10	
	28		4	113 112	17,51 17,46	0,87 1,23	0,09 0,12	
	38		6	111 111	15,86 16,24	1,00 0,88	0,10 0,09	
	48		8	126 120	13,15 12,02	1,06 1,40	0,10 0,13	
	29	K		109 200	10,45 10,39	1,10 0,72	0,11 0,06	
	39			117 110	10,56 10,61	1,16 0,86	0,11 0,09	
	49			114 125	10,61 11,56	0,94 0,87	0,09 0,08	
ACRIDIN-ORANGE Färbung	Serie IV							
	Tier-Nr.	Dosis HC (mg/200 KG)	Ver-suchsdauer (Tage)	Kern-zahl n	$\bar{x}$	s	s $\bar{x}$	
	4	5	1	109	14,73	0,88	0,09	
	14		2	110	20,55	0,87	0,10	
	24		4	114	15,68	0,90	0,09	
	34		6	116	16,25	0,94	0,09	
	44		8	129	16,05	0,92	0,09	
	5	25	1	116	19,05	1,26	0,12	
	15		2	108	20,15	0,84	0,09	
	25		4	109	17,45	0,86	0,09	
	35		6	117	15,82	1,06	0,10	
	45		8	114	13,09	1,04	0,10	
	10	K		111	12,20	1,29	0,13	
	20			108	12,27	1,19	0,11	

Tabelle 5:

Acridinorange-Färbung der Serien III und IV

Serie III: obere Zahlenreihe - Werte für "gereinigtes" Acridinorange
untere Zahlenreihe- Werte für ungereinigtes Acridinorange

Serie IV: Färbung mit "gereinigtem" Acridinorange

$\bar{x}$ = Mittelwert der Fluoreszenzemissionen in AE
(1 AE = 0,002 μ A / Skalenteil)

s = Standardabweichung

s $\bar{x}$ = Standardabweichung des Mittelwertes

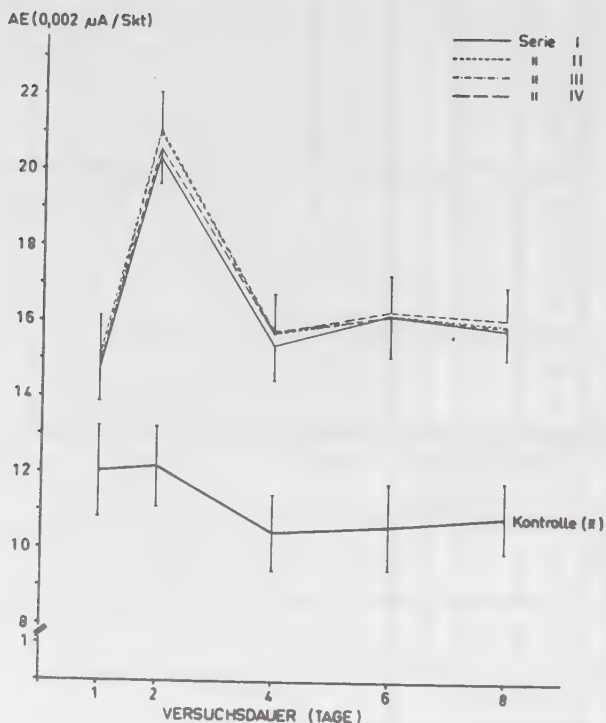


Abb. 3 :

Verlaufskurven der Serien I - IV. Färbung mit "gereinigtem" Acridinorange nach Behandlung mit 5 mg Hydrocortisonacetat/200 g Körpergewicht/die.

Darstellung der Mittelwerte ($\bar{x}$) mit Standardabweichung.

Kontrolle: Mittelwert ($\bar{x}$) mit Standardabweichung (s) zweier unbehandelter Tiere.

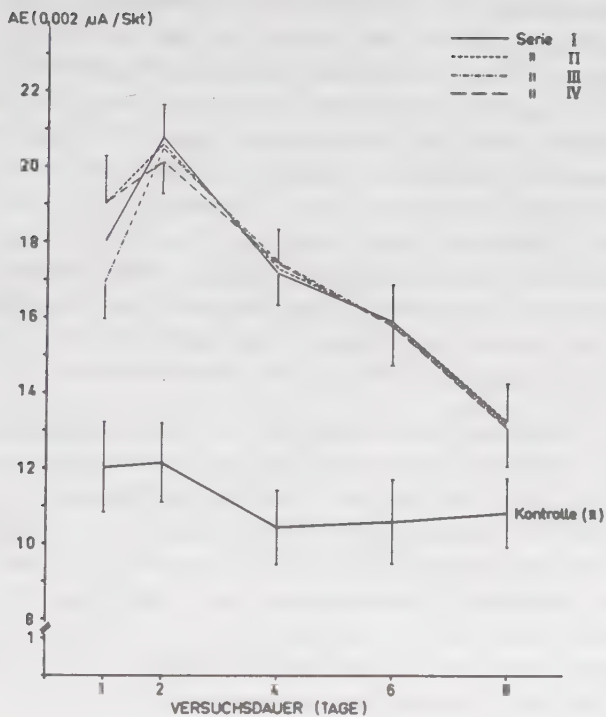


Abb. 4 :

Acridinorange-Verlaufskurven (Mittelwert $\bar{x}$ mit Standardabweichung s) nach Behandlung mit 25 mg Hydrocortisonacetat/200 g Körpergewicht/die.

Die Kontrolle umfaßt 2 Tiere an jedem Versuchstag.

Beide behandelten Tiergruppen haben annähernd gleiche Werte von 20,6 AE gegenüber den Ausgangswerten der unbehandelten Ratten von 12 Einheiten. Das bedeutet eine 70 %-ige Steigerung der Farbstoffbindungskapazität am 2. Behandlungstag. Am 4. Tag fallen die Kurven beider Tiergruppen ab. Dabei lassen die Werte der Dosierungsgruppe mit 25 mg/200 g Körpergewicht/die im Vergleich zu der 5 mg-Gruppe eine nur geringgradig höhere Farbstoffbindungskapazität erkennen. Bis zum Versuchsende sinkt dann die Fluoreszenzemission fast linear auf 13,1 Einheiten. Sie liegt damit nur knapp über den Werten der Kontrolltiere mit 10,8 Einheiten. Dagegen verbleibt die Fluoreszenzemission der mit 5 mg Hydrocortison behandelten Tiere bei dem langen Versuchszeitraum auf einem etwa 50 % höheren Niveau gegenüber den unbehandelten Ratten.

Abbildung 5 gibt den Kurvenverlauf der Simultanmessungen mit "gereinigtem" und ungereinigtem Acridinorange wieder. Es wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Serien I und III gebildet und verglichen. Es ist ersichtlich, daß die Reinigung des Acridinorange nach der beschriebenen Methode die Anlagerung des Farbstoffmoleküls an den DNP-Komplex nicht verbessert. Der unterschiedliche Reinheitsgrad scheint also keinen Einfluß auf die Wechselwirkungen der Reaktionspartner zu nehmen.

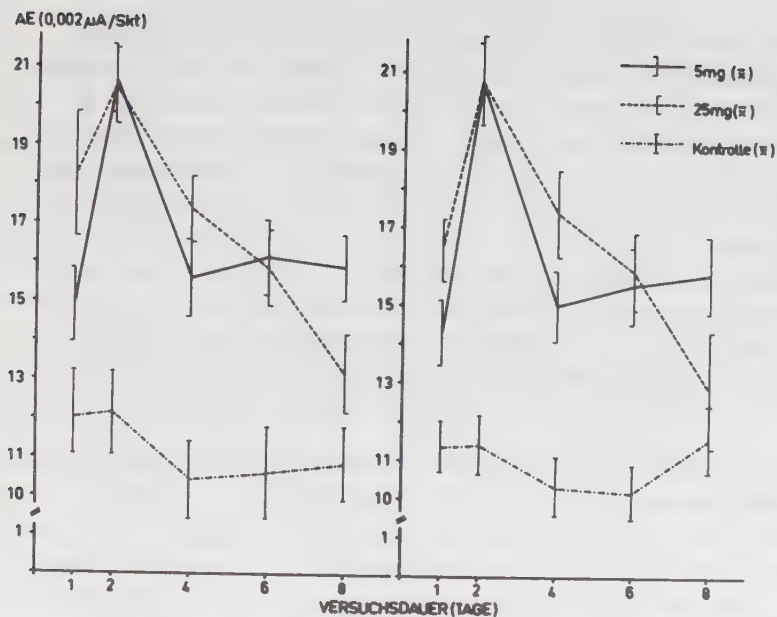


Abb. 5a

Abb. 5b

Abb. 5 :

Gegenüberstellung der Verlaufskurven für die Färbung mit "gereinigtem" Acridinorange (Abb. 5a) und ungereinigtem Acridinorange (Abb. 5b).

$\bar{x}$ = Mittelwert; s = Standardabweichung

3. Feulgen-Nuclear-Reaktion zur Bestimmung des nukleären DNA-Gehaltes

Nach Feulgenfärbung wurden bei 570 nm die Fluoreszenz-emissionen der diploiden Leberzellkerne von je 2 behandelten Tieren der verschiedenen Dosisgruppen und von den beiden Kontrolltieren eines Versuchszeitraumes gemessen. Als Referenzsystem wurden die Farbstoffbindungskapazitäten homologer Lymphozyten in denselben Ausstrichpräparaten bestimmt. In Tabelle 6 sind neben der laufenden Tiernummer, Dosisgruppe und Versuchsdauer die Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardabweichungen der Mittelwerte der Kernmeßwerte aller Präparate zusammengestellt. In der oberen Zeile stehen die Werte für die Leberzellkerne, darunter die Werte der homologen Lymphozyten.

Die Abbildung 6 gibt in Form eines Säulenhistogramms diese Ergebnisse wieder. In dem Koordinatensystem ist die Fluoreszenzemission in Arbeitseinheiten ($1 \text{ AE} = 0,002 \text{ } \mu\text{A} / \text{Skalenteil}$) auf der Ordinate gegen die Versuchsdauer auf der Abszisse aufgetragen. Zum Vergleich sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Leberzellkerne als Säulen, als gestrichelte Linie der Mittelwert mit Standardabweichung aller Lymphozyten dargestellt.

Die Meßergebnisse lassen erkennen, daß an den ersten 4 Tagen der Hormonbehandlung die Fluoreszenzemissionen der Leberzellkerne untereinander nur gering abweichen. Ebenso treten keine wesentlichen Unterschiede zu den ermittelten Werten der Lymphozyten auf. In dem späten Versuchsstadium machen sich Differenzen in der Farbstoffbindungskapazität zwischen Lymphozyten und Leberzellkernen bemerkbar. Dennoch sind an diesen Tagen keine eindeutigen Unterschiede oder definierbare Verschiebungen zu beobachten.

Tier- Nr.	Dosis HC (mg/ 200 g)	Versuchs- dauer (Tage)	Kernzahl n	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$
1	5		61	11,48	0,98	0,13
2	5	1	63	11,62	0,87	0,11
			61	11,89	0,84	0,11
9	K		65	11,63	0,91	0,11
			60	11,45	0,95	0,12
			64	11,33	1,01	0,13
11	5		63	11,25	1,12	0,14
12	5	2	62	11,06	1,11	0,15
			65	10,91	1,00	0,13
19	K		61	10,84	1,17	0,15
			62	10,69	0,93	0,12
			64	10,64	1,04	0,14
21	5		66	11,61	0,96	0,12
22	5	4	75	11,60	0,94	0,11
			57	11,77	0,85	0,12
29	K		59	11,56	1,07	0,14
			61	11,98	0,83	0,11
			60	12,00	0,84	0,11
31	5		86	11,06	1,45	0,16
32	5	6	68	9,79	1,02	0,13
			88	10,74	1,15	0,13
39	K		64	10,16	0,12	0,09
			63	10,29	0,97	0,13
			59	10,14	0,86	0,12
41	5		77	11,44	1,23	0,14
42	5	8	70	10,17	1,01	0,12
			64	12,14	1,22	0,16
49	K		66	10,27	1,12	0,14
			80	10,66	1,22	0,14
			73	10,48	1,17	0,14
7	25		61	11,54	1,01	0,13
8	25	1	60	11,58	1,11	0,15
			60	11,57	0,96	0,13
10	K		60	11,53	0,89	0,12
			61	11,36	1,03	0,14
			67	11,10	1,05	0,13
17	25		60	11,08	1,06	0,14
18	25	2	62	11,73	0,96	0,13
			68	10,96	1,09	0,13
20	K		64	10,55	1,23	0,16
			61	10,69	0,89	0,12
			61	10,75	1,01	0,13
27	25		66	11,97	0,77	0,10
28	25	4	60	11,78	0,88	0,12
			61	11,54	0,94	0,13
30	K		61	11,70	0,94	0,12
			64	11,63	1,15	0,15
			65	11,83	0,84	0,11
37	25		66	11,62	1,08	0,14
38	25	6	69	10,42	0,98	0,12
			70	11,64	1,14	0,14
40	K		61	10,46	1,18	0,16
			61	9,67	1,03	0,14
			61	10,00	0,88	0,12
47	25		66	10,65	1,15	0,15
48	25	8	70	9,47	1,00	0,12
			60	10,33	1,10	0,15
50	K		71	9,68	1,09	0,13
			82	10,27	1,23	0,14
			82	10,52	1,24	0,14

Tabelle 6:

Feulgen-Nucleal-Reaktion für je 2 Versuchstiere mit 5 mg bzw. 25 mg Hydrocortison/200 g Körpergewicht und einem Kontrolltier für die bestimmte Versuchsdauer. Die obere Zeile gibt die Meßwerte für diploide Leberzellkerne, die darunterstehende Zeile zeigt die Werte für die homologen Lymphozyten als Referenzsystem.

$\bar{x}$ = Mittelwert der Fluoreszenzemissionen in AE
(1 AE = 0,002 μ A/Skalenteil)

s = Standardabweichung

$s_{\bar{x}}$ = Standardabweichung des Mittelwertes.

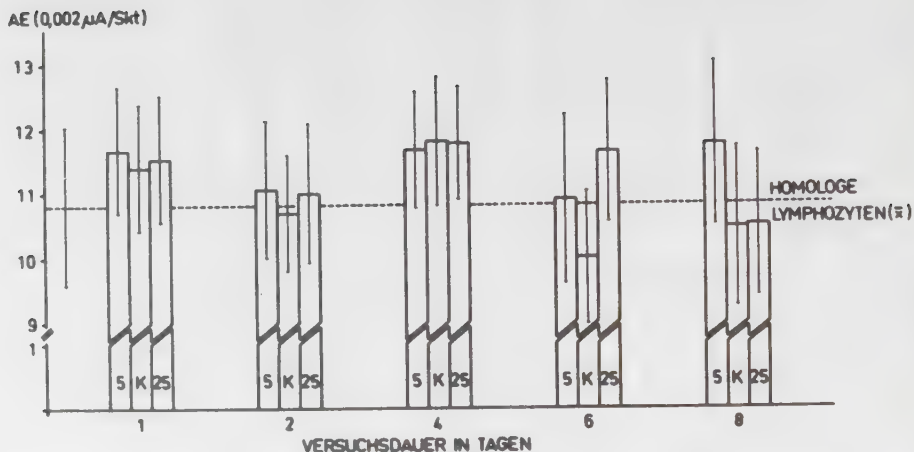


Abb. 6 :

Mittlere Fluoreszenzemission (in AE) mit Standardabweichungen nach Feulgen-Nucleal-Reaktion (diploide Rattenleberzellkerne, Hydrocortisonacetat in der Dosierung von 5 oder 25 mg/200 g Körpergewicht/1,2, 4,6 und 8 Tage).

K = unbehandelte Tiere

Als Referenzsystem dienten homologe Lymphozyten.

($\bar{x}$ = Sammel-Mittelwert aus den 5 Versuchsansätzen)

4. Fastgreen-FCF-Reaktion zur Bestimmung nukleärer basischer Proteine

Die Fluoreszenzemission wurde nach der Färbung bei 610 nm gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 statistisch und in Abbildung 7 graphisch zusammengefaßt.

Die Tabelle entspricht in der Anlage der Tabelle 6: In der oberen Zeile der Tiernummer stehen die Werte der Leberzellkerne, darunter die der Lymphozyten. Ähnlich der Feulgen-Nucleal-Reaktion beobachtet man bei dieser histochemischen Methode zur Darstellung der basischen nukleären Proteine an allen Versuchstagen keine erheblichen Unterschiede im Verhalten der Leberzellkerne gegenüber dem Farbstoff. Auch beim Vergleich mit dem Referenzsystem sind keine nennenswerten Unterschiede zu finden. Nur am 6. Versuchstag ist eine generelle Erhöhung der Fluoreszenzemissionen zu beobachten, die wahrscheinlich auf methodischen Fehlern beruht.

Tier Nr.	Dosis HC (mg/kg)	Ver- suchs- dauer (Tage)	Kern- zahl	FASTGREEN-FCF REAKTION		
				$\bar{x}$	S	S $\bar{x}$
1	5		71	12,45	1,03	0,12
			62	12,68	1,07	0,14
2	5	1	62	12,35	1,17	0,15
			57	12,51	1,23	0,17
9	K		62	12,92	0,88	0,10
			60	12,68	0,70	0,10
11	5		62	12,76	0,80	0,11
			58	12,83	0,73	0,10
12	5	2	62	13,58	0,92	0,12
			57	13,89	0,88	0,12
19	K		58	12,81	0,69	0,10
			59	12,55	0,80	0,11
21	5		67	12,69	1,00	0,13
			65	12,35	1,05	0,13
22	5	4	62	12,66	1,07	0,14
			61	12,43	1,23	0,16
29	K		61	12,39	0,99	0,13
			62	12,73	1,03	0,13
31	5		75	14,80	0,90	0,11
			75	14,25	0,93	0,11
32	5	6	110	15,15	0,91	0,09
			66	14,42	0,92	0,12
39	K		70	14,26	1,14	0,14
			66	14,23	0,91	0,12
41	5		68	12,29	1,29	0,16
			71	11,56	1,30	0,16
42	5	8	87	12,60	1,21	0,14
			66	11,33	1,25	0,16
49	K		64	12,63	1,23	0,16
			58	12,45	1,49	0,20
7	25		62	12,89	0,98	0,13
			60	12,58	0,91	0,12
8	25	1	60	12,75	0,82	0,11
			50	12,84	0,98	0,14
10	K		61	12,92	0,88	0,12
			52	12,50	0,90	0,13
17	25		63	13,02	0,83	0,11
			60	13,15	0,92	0,12
18	25	2	62	13,48	0,99	0,13
			65	13,49	0,92	0,12
20	K		61	12,85	0,95	0,13
			60	12,72	0,74	0,10
27	25		67	12,79	1,01	0,13
			69	12,49	1,02	0,13
28	25	4	88	12,90	1,24	0,15
			81	12,56	1,21	0,14
30	K		60	12,58	1,17	0,16
			61	12,38	0,99	0,13
37	25		89	15,22	1,05	0,12
			62	14,21	0,89	0,12
38	25	6	78	15,71	1,11	0,13
			69	14,80	0,88	0,11
40	K		80	14,10	0,90	0,13
			67	14,42	1,10	0,14
47	25		69	13,67	0,94	0,12
			69	11,51	1,23	0,15
48	25	8	61	14,09	1,18	0,16
			58	11,67	1,25	0,17
50	K		62	12,56	1,34	0,17
			65	12,22	1,51	0,17

Tabelle 7:

Fastgreen-FCF-Reaktion: Je zwei Tiere mit der Dosierung 5 mg oder 25 mg Hydrocortisonacetat/200 g Körpergewicht/die und eine Kontrolle.

Obere Zeile: Werte der diploiden Leberzellkerne

Untere Zeile: Homologe Lymphozyten als Referenzsystem

$\bar{x}$ = Mittelwert der Fluoreszenzemissionen in AE
(1 AE = 0,002 μ A/Skalenteil)

S = Standardabweichung

S $\bar{x}$ = Standardabweichung des Mittelwertes

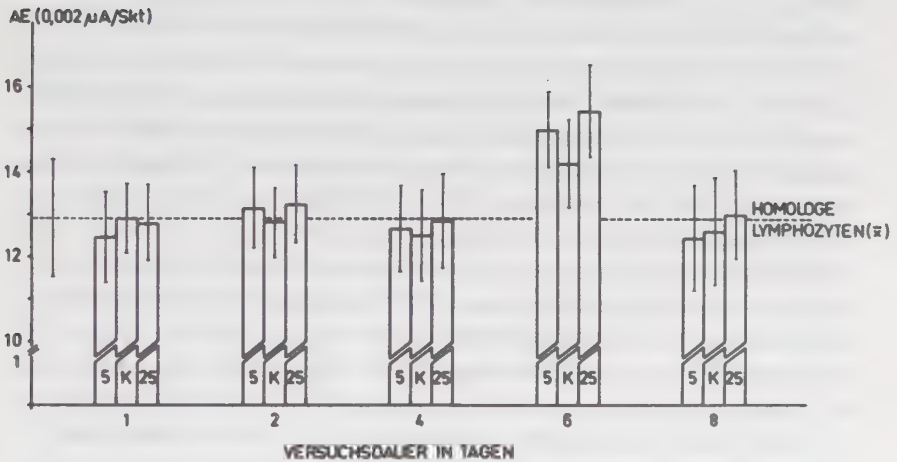


Abb. 7 :

Mittlere Fluoreszenzemission (in AE) mit Standardabweichungen nach Fastgreen-FCF-Reaktion (diploide Rattenleberzellkerne, Hydrocortison in der Dosierung von 5 oder 25 mg/200 g Körpergewicht/1,2, 4,6 und 8 Tage).

K = unbehandelte Tiere

Als Referenzsystem dienten homologe Lymphozyten.
($\bar{x}$ = Sammel-Mittelwert der 5 Versuchsansätze)

IV. Diskussion

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Corticosteroidderivat wird aus dem Blut durch bis heute unbekannte Mechanismen in die Leberzelle geschleust. FIALA und LITWACK (1966) fanden das Hormon schon kurze Zeit nach Applikation in subzellulären Kompartimenten (Zytoplasma, Mikrosomen, Nukleus). Sie wiesen auf Komplexe zwischen Hydrocortison und zytoplasmatischen Makromolekülen hin. Nach KARLSON (1973) hat dieser zytoplasmatische Rezeptor zunächst die Aufgabe, das Hormon im Zytoplasma der Zellen zu binden und zu akkumulieren. Chromatographisch konnten spezifische zytoplasmatische Rezeptor-Protein-Fraktionen bestimmt werden (BEATO et al. 1969 a, 1970, 1971, 1972), deren Sedimentationskonstante 4 S beträgt. Nach MOREY und LITWACK (1969) soll das Molekulargewicht dieser Proteine 37 000 (= 3,47 S) und 6 950 betragen. Die genaue physiologische Bedeutung der Rezeptormoleküle ist noch ungeklärt. Möglicherweise passiert das Hormon die Kernmembran in Bindung an diese 4-S-Komplexe. Im Nucleus wird das Steroidhormon an ein dem zytoplasmatischen Rezeptorprotein unterschiedliches Eiweiß-Makromolekül, das bei 8 - 10 S sedimentiert, gekoppelt (BEATO et al. 1969 a, 1970).

Die Wirkung des Hydrocortisons in der Leberzelle zeigt sich auf der Transcriptionsebene in einer erhöhten Matrizenaktivität der DNA und gleichzeitiger Steigerung der DNA-abhängigen RNA-Polymeraseaktivität, so daß die Transcriptionsrate aller nukleären RNA-Fraktionen stark erhöht ist (AGARWAL et al., 1969; BARNABEI und SERENI, 1964; BEATO et al., 1968 a+b; DAHMUS und BONNER, 1965; FEIGELSON et al., 1962; GREENMAN et al., 1965; HANOUNE u. FEIGELSON, 1970; JERVELL u. OSNES, 1964; KENNEY u. KULL, 1963; KENNEY et al., 1965; LANG u. SEKERIS, 1964; LUKACS u. SEKERIS, 1967; YU u. FEIGELSON, 1971). Dadurch wird die Proliferation des

endoplasmatischen Reticulums mit gesteigerter Proteinbiosynthese, die Glycogenanreicherung und die zytoplasmatische Volumenzunahme erklärlich (CARDELL, 1972; CLARK u. PESCH, 1956; GOODLAD u. MUNRO, 1959; LEON, 1966; LOWE u. RAND, 1956; WEBER et al., 1965; WIENER et al., 1968).

Die Cortisonwirkung auf das Chromatin besteht also offenbar darin, eine Derepression genetischer Loci auf den DNA-Strängen herbeizuführen.

Diese Interpretation der Hormonwirkung auf die Funktionsstrukturen der Zellkerne basiert auf dem von JACOB und MONOD (1961) postulierten Modell. Es wurde an *Escherichia coli* Stämmen entwickelt: Ein nukleärer Repressor blockiert die Transcription genetischer Information, verliert diese Fähigkeit aber durch die Reaktion mit einem Induktor (bei den Bakterien das Substrat). Ob dieses Prinzip der Wechselwirkung zwischen Induktor, DNA und Kernproteinen auf höhere Organismen übertragbar ist, bleibt umstritten. Hormone werden in diesem System einer hierarchischen Kompetenzpyramide als "allosterische Effektoren" (HARBERS, 1969) betrachtet, die im Erfolgsorgan in spezifischer Weise mit bestimmten Repressormolekülen in Wechselwirkung treten.

In Eukaryontenzellen liegt die DNA in einem Nukleoproteid-Komplex vor. Man unterscheidet dabei zwei Arten von Chromatin: das feingranuläre Euchromatin mit genetisch aktivierbarer Struktur sowie das kondensierte, dichtgepackte Heterochromatin als genetisch inaktive Form. Das sogenannte "Heterochromatin" wird als Gradmesser der genetischen Aktivität des Zellkerns angesehen (HARBERS u. SANDRITTER, 1973). Durch Fraktionierung kann das Chromatin in 4 Hauptgruppen aufgetrennt werden:

(1) Die Desoxyribonukleinsäure (DNA = DNS) stellt eine geordnete, doppelsträngige, helicale Nukleotidkette dar, welche die gesamte genetische Information als Matrize zur Transcription der RNA gespeichert hält. Die DNA-PO₄-Gruppen werden als die eigentlichen aktiven Strukturelemente angesehen (LÖHR, 1973; RIGLER et al., 1969).

(2) Die sauren Kernproteine haben einen hohen Anteil an Asparagin- und Glutaminsäure. Ihr Gehalt ist stoffwechselaktiven Geweben hoch. Sie zeigen eine nur schwache Bindung an die DNA.

(3) Die nukleäre oder chromosomale RNA ist kurzkettig, chemisch heterogen und mit Kernproteinen und DNA verbunden. Ihre Aufgabe ist noch weitgehend ungeklärt. Es wird vermutet, daß sie als Operator-Detektor dient (BONNER, 1967).

(4) Als Histone werden basische Kernproteine mit einem mittleren Molekulargewicht von 20 000 (BONNER, 1967) bezeichnet. Sie sind über freie Aminosäuren an die DNA gebunden. Sie blockieren durch diese Wechselwirkung möglicherweise die genetische Aktivität der DNA-Matrize (HARBERS, 1969; HARBERS u. SANDRITTER, 1973; KNIPPERS, 1971; SLUYSER, 1967). Die Histone können chromatographisch in 3 Hauptfraktionen aufgetrennt werden: in eine sogenannte lysinreiche und lysinarme sowie eine sogenannte argininreiche Fraktion.

Histonen und sauren Kernproteinen wurden neben strukturstabilisierenden Aufgaben repressorische und derepressorische Aktivitäten zugeschrieben (BONNER, 1965; HUANG u. BONNER, 1962; KNIPPERS, 1971; MONDER u. WALKER, 1970; SLUYSER, 1967; TSAI u. HNILICA, 1971). Ihr Stoffwechsel ist Inhalt zahlreicher Untersuchungen gewesen (BUCK u. SCHAUDER, 1970; MURTHY et al., 1970).

Während der Metabolismus der basischen Kernproteine im Rahmen der täglich anfallenden Stoffwechselaufgaben unberührt bleibt, weiß man, daß zum Beispiel unter der Einwirkung von Corticosteroiden im Zellkern eine de-novo Biosynthese saurer Proteine eingeleitet wird. Durch den Überschuß an diesen Eiweißkörpern wird möglicherweise das funktionelle Wechselspiel zwischen Histonen und der DNS entscheidend beeinflusst.

Die Rolle der Histone im Rahmen einer Cortison-induzierten Proteinbiosynthese konnte bis heute noch nicht befriedigend abgeklärt werden. Während TSAI und HNILICA (1971) bei ihren in-vitro Versuchen keine hervorragende Bindungsaffinität zwischen dem Nebennierenrindenhormon und den verschiedenen Histonfraktionen beobachteten, zeigten MONDER und WALKER (1970), daß die sogenannte argininreiche F_3 -Histon-Fraktion der direkte Reaktionspartner der Corticosteroide darstellt. Dabei sollen die Corticosteroide an die hydrophoben Aminosäure-Residuen im Bereich der C-terminalen Regionen der Histone oder aber an die Guanidino-Gruppen des Arginins angelagert werden. SLUYSER (1969) wiederum postuliert eine Bindung an die lysinreiche Histonfraktion. Dadurch sollen die Steroidhormone in der Lage sein, die Bindung zwischen DNA und basischen Eiweißkörpern zu kontrollieren.

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen lassen erkennen, daß durch Hydrocortison am Nukleoprotein-Komplex Änderungen der Bindungskapazitäten für verschiedene Farbstoffe auftreten. Die angewandten histochemischen Färbereaktionen erfassen quantitativ in einer spezifischen Reaktion genetisch aktive Bausteine der DNA und der basischen Kernproteine.

Der basische Farbstoff Acridinorange bindet sich an freie Anionen im Zellkern. Dazu gehören die organischen funktionellen Gruppen und die sterisch "freien" Nukleinsäure- PO_4 -Gruppen des DNP-Komplexes. Bei der in der Tertiärstruktur

helical angeordneten DNA schiebt sich das Acridinorange-Molekül nach annähernd jedem 3. Basenpaar in die Helix ein und steht über seine Dimethylgruppen mit den PO_4^- -Gruppen eines jeden DNA-Stranges in Kontakt. Es besteht eine monomolekulare Bindung des Farbstoffes an die DNA im Verhältnis von etwa 1 : 6 (RIGLER, 1966).

Bei einsträngiger Nukleinsäurestruktur dagegen (z.B. RNA) steigt die Acridinorange-Bindungskapazität auf ungefähr 1 : 1,5 an und ruft ein Emissionsmaximum bei 650 - 655 nm hervor. Durch Einstellen des pH auf 4,1 wird die Dissoziation der organischen und anorganischen Anionen zurückgedrängt. Die Acetylierung verhindert, daß kompetitive Gruppen, z.B. NH_4^+ -Gruppen, mit dem gleichgeladenen Farbstoffmolekül um die Nukleinsäure- PO_4^- -Gruppen konkurrieren (RIGLER, 1966). Unter diesen Färbe- und Meßbedingungen ist die Farbstoffbindungskapazität des DNP für Acridinorange also abhängig von der "Freisetzung" anionischer DNA- PO_4^- -Gruppen. Nach Untersuchungen von HUANG und BONNER (1962) sind die "freien" DNA- PO_4^- -Gruppen für die genetische Regulation der Informationsübertragung (Transcription) von wesentlicher Bedeutung. Sie dienen basischen Kernproteinen als Haftpunkte, wobei maximal 65 % der DNA- PO_4^- -Gruppen durch Histone blockiert werden können.

Die Stimulierung mit Hydrocortisonacetat bewirkt im Verlauf des Versuches an den untersuchten Rattenleberzellkernen eine Demaskierung und "Freisetzung" der DNA- PO_4^- -Gruppen. Dieses könnte mit einer Aktivierung der Matrizenaktivität einhergehen. Veränderungen der Acridinorange-Farbstoffbindungskapazität des DNP von Leberparenchymzellen durch Wachstum, Alterung und hormonelle Einflußnahme wurden von PUPPE-ERDMANN (1971), HEIMER (1972), LÖHR und HEIMER (1972), LÖHR (1973), LÖHR u. Mitarbeiter (1974 a+b) und MÜLLER u. Mitarbeiter (1974) beschrieben.

Die Untersuchungen von AUER et al. (1970), BOLUND et al. (1970), DARZYNKIEWICZ et al. (1970), KILLANDER und RIGLER (1969), RIGLER und KILLANDER (1969), RIGLER et al. (1969), RINGERTZ et al. (1970) und ZETTERBERG und AUER (1970) mit Phytohaemagglutinin stimulierten (PHA) menschlichen Lympho- und Leukozyten, He-La-Zellen, Mäusefibroblasten und anderen Organsystemen beweisen, daß der Anstieg der Acridinorange-Bindungskapazität ein Maß für die "Freisetzung" der DNA- PO_4 -Gruppen ist. Diese "Freisetzung" geht mit einer Aktivierung des DNA einher, welches sich in einer simultanen Steigerung der De-novo-Biosynthese nukleärer RNA-Fraktionen widerspiegelt.

Dies geht aus einer Analyse der RNA-Fraktionen durch LÖHR und Mitarbeiter (1974 a+b+c) und MÜLLER und Mitarbeiter (1974) unter Hydrocortison- und Trijodthyronin-Stimulation hervor. Nach Aufzeichnung des Polyribosomenprofils konnte eine deutliche Biosynthesesteigerung von m-RNA beobachtet werden.

Aufgrund dieser histochemischen Verhältnisse ist es möglich, die hormonelle Einflußnahme auf die Funktionsstrukturen in folgender Weise zu interpretieren:

Schon nach einer Latenz von 5 Stunden kann eine Reaktion des DNP auf die Hormonzufuhr erfaßt werden. Sie äußert sich in der Steigerung der Farbstoffbindungskapazität der "freien DNA- PO_4 "-Gruppen für Acridinorange und einer gleichzeitigen Freisetzung von Guanidino-Gruppen des Arginins. Nach dem Maximum der Fluoreszenzemission am 2. Tag zeigen die Meßwerte der Acridinorange- und Phenanthrenchinon-Färbung bei der weiteren Behandlung einen annähernd parallelen Verlauf. Das Chromatin der mit 5 mg Hydrocortisonacetat/200 g Körpergewicht/die behandelten Tiere reagiert im letzten Versuchsstadium mit einer permanent erhöhten Freisetzung der reagiblen Molekülgruppen, während die Meßwerte bei einer Dosierung von 25 mg/die am Ende der

Versuchsserie fast auf dem Niveau der unbehandelten Tiere liegen. Gleichartige Beobachtungen machte LÖHR (1973) nach 10-tägiger Dauerbehandlung mit unterschiedlichen Dosisgruppen (5 mg, 15 mg, 25 mg Hydrocortisonacetat/150 g Körpergewicht/die/10 Tage) und hob die deutlich geringeren Meßwerte bei der Gabe von 25 mg/die als bei 5 mg/die hervor.

Ob dieser paradoxe Cortisoneffekt ein kurzfristiges Ereignis ist, und dieser in der Leber anabole Effekt sich hier niederschlägt, kann nicht gezeigt werden. Dieser Verlauf ist vermutlich auf die hohe Dosierung mit einem erheblichen zytotoxischen Einfluß zurückzuführen.

Schließlich bleibt zu überlegen, ob die Emissionen nicht auch durch die von LÖHR (1973) beschriebenen infektiösen Granulomatosen in Leber und anderen Organen der Tiere bei hohen Hormongaben beeinflußt werden könnten.

Die gleichzeitig durchgeführte Feulgen-Nucleal-Reaktion diente bei diesen Untersuchungen dazu, die DNA-Konstanz während der hormonellen Einflußnahme auf den DNP-Komplex zu erfassen. Die Schwankungen der einzelnen Feulgenwerte bei den eigenen Untersuchungen zwischen den Leberzellkernen und den homologen Lymphozyten, besonders in den letzten Untersuchungsgruppen, beruhen nicht auf einer Erhöhung oder Verminderung des DNA-Gehaltes, sondern sind in dem von SPRENGER (1971) postulierten Proportionalitätsfaktor der Funktionszustände des DNP, dem nukleären Wassergehalt und den dosisabhängigen Strukturveränderungen des Chromatins zu suchen. Auch die Bindungsverhältnisse zwischen den einzelnen nukleären Bausteinen beeinflussen die Feulgen-Nukleal-Reaktion. So haben die heterochromatischen Anteile und das funktionell aktive Euchromatin wegen der unterschiedlichen Säureempfindlichkeit eine verschiedene Affinität zu den Farbstoffmolekülen.

Diese Beobachtungen weisen auch auf die verschiedenen Funktionszustände und Wechselwirkungen der DNA mit den basischen Kernproteinen hin (NOESKE, 1968).

Nach GLEDHILL et al. (1966) sind die Schwankungen der Feulgenwerte kein Anhalt für Änderungen des DNA-Gehaltes. Im allgemeinen ist er bei Eukaryonten von Geburt bis zum Tod als konstante Größe aufzufassen (HARBERS u. SANDRITTER, 1973).

Den Änderungen der Farbstoffbindungskurven bei Acridinorange-Färbung laufen die Fluoreszenzemissionen nach Phenanthrenchinon-Färbung parallel. Die empfindliche Reaktion zeigt eine spezifische Affinität des Farbstoffes zum Arginin im Nukleoproteid-Komplex, welcher wahrscheinlich den Histonen angehört.

Die verschiedenen nukleären Histon-Fraktionen lagern sich aufgrund der Sekundärstruktur der DNA an bevorzugten Bindungsstellen der Helix an. Der überwiegende Teil der Histone ist wahrscheinlich in der großen Rille lokalisiert und repräsentiert die genetische Information (HARBERS, 1969). Ihre 3. Fraktion zeigt einen hohen Gehalt an Argininresiduen (BONNER, 1967). Die dosisabhängige "Freisetzung" und Demaskierung der DNA- PO_4 -Gruppen mit der simultanen Markierung der Guanidinogruppen der Argininresiduen im Nukleoproteid-Komplex weist auf eine Wechselwirkung dieser Chromatinbestandteile hin (HNILICA, 1967; ZETTERBERG u. AUER, 1970). Dieses bedeutet, daß die Histone durch die hormonelle Einflußnahme aus ihrer Bindung herausgelöst werden und daraus eine Steigerung der Matrizenaktivität resultiert. Sie sollen dabei durch Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung oder Sulfhydrylierung einen Strukturwandel erfahren, der eine DNA-Histon-Bindung unmöglich macht (ALLFREY, 1970; GALLWITZ, 1971; KAPLOWITZ et al.,

1971; SCHILTZ u. SEKERIS, 1969). Welche Rolle die sauren Kernproteine auf den Repressionsgrad der DNA durch die direkte Bindung an die Histone oder aber an die DNA-Stränge spielen, ist bisher nicht geklärt.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Argininresiduen der Histone bei der Hormonbehandlung unbeeinflusst bleiben und von Farbstoffmolekülen markiert werden können. Beim Vergleich der Farbstoffbindungskapazitäten zeigt sich am zweiten Tag bei der Acridinorange-Färbung ein höherer Meßwert als bei der Phenanthrenchinon-Färbung. Daraus kann man schließen, daß ein Teil der freien Bindungsstellen des Arginins blockiert wird oder aber das Protein durch die aufgehobene Bindung metabolisiert wurde.

Daß es sich bei der Steigerung der Farbstoffbindungskapazität für Phenanthrenchinon nicht um eine de-novo Biosynthese von sog. argininreichen Histonen handelt, soll die beigeordnete Fastgreen-FCF-Reaktion zeigen. Sie erfaßt - entsprechend der Feulgen-Nucleal-Färbung - den relativen Gehalt an basischen Proteinen im Nukleoprotein, und sie läßt eine Aussage darüber zu, ob der Histonmetabolismus durch die Hormonwirkung verändert wird.

Beim Vergleich der Meßergebnisse fällt auf, daß über den gesamten Versuchszeitraum keine Unterschiede am Gesamthistonanteil der DNP durch die hormonelle Einwirkung eingetreten ist. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Untersuchungen von MURTHY et al. (1970), der zeigen konnte, daß Cortisol keinen Einfluß auf den Metabolismus von DNA und Histonen nimmt.

Zusammenfassend beruht somit die Cortison-induzierte Beeinflussung der Matrizenaktivität der DNA mit gleichzeitiger Aktivierung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase in einer Derepression blockierter DNA-PO₄-Gruppen. Die Dissoziation

der DNA-Histon-Bindung bestätigt sich durch die gleichartige Erhöhung der Farbstoffbindungskapazitäten der Phosphat- und Guanidinogruppen der DNP-Bausteine, ohne Änderung der Feulgen- und Fastgreen-Werte.

Welche molekularen Reaktionen durch den Hormon-Rezeptor-Komplex primär ausgelöst werden, welches sein direkter Reaktionspartner und wie die Wechselwirkung zwischen DNA, Histonen und Nichthistonen verändert wird, ist bisher unbekannt und durch die in dieser Arbeit angewandten Methode nicht erklärbar.

V. Zusammenfassung

Das hier untersuchte Hormon Hydrocortisonacetat nimmt durch direkte Wechselwirkungen mit nukleären Funktionsbausteinen Einfluß auf die Transcription der genetischen Information.

Mit Hilfe der fluoreszenz-zytrophotometrischen Untersuchungen nach Acridinorange- und Phenanthrenchinonfärbung sowie der Feulgen-Nukleal- und Fastgreen-FCF-Reaktion kann die hormonelle Stimulation des Chromatins quantitativ und qualitativ erfaßt werden. An Rattenleberzellkernen wurden die dosisabhängigen Farbstoffbindungskapazitäten des DNP als Dosis-Zeit-Kurven aufgestellt und diskutiert. Es zeigt sich ein analoger Verlauf der Kurven für Acridinorange und Phenanthrenchinon. Die hormoninduzierte Demaskierung histonreprimierter DNA- PO_4 -Gruppen und die simultane Markierung von Guanidino-Gruppen, die wahrscheinlich vorwiegend der sogenannten argininreichen Histonfraktionen zugehören, deutet auf eine Bindung zwischen diesen Molekülgruppen hin. Die Dissoziation der DNA-Histon-Bindung erklärt die gesteigerte De-novo-Biosynthese nukleärer m-RNA. Die gleichzeitig durchgeführte Feulgen- und Fastgreen-Reaktion bestätigt die Konstanz des nukleären DNA- und Histonproteingehaltes.

VI. Literaturverzeichnis

1. AGARWAL, M.K., J. HANOUNE, F.L. YU, I.D. WEINSTEIN and P. FEIGELSON: Studies on the effect of cortisone on rat liver transfer ribonucleic acid.
Biochemistry 8, 4806-4812 (1969)
2. ALFERT, M. and I.J. GESCHWIND: A selective staining method for the basic proteins of cell nuclei.
Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.) 39, 991-999 (1953)
3. ALLFREY, V.G.: Changes in chromosomal proteins at times of gene activation.
Fed.Proc. 29, 1447-1460 (1970)
4. AUER, G., A. ZETTERBERG and D. KILLANDER: Changes in binding between DNA and arginine residues in histone induced by cell crowding.
Exp.Cell Res. 62, 32-38 (1970)
5. BARNABEI, A. and F. SERENI: Cortisol-induced increase of tyrosine- α -ketoglutarate transaminase in the isolated perfused rat liver and its relation to ribonucleic acid synthesis.
Biochim.Biophys.Acta (Amst.) 91, 239-247 (1964)

6. BAXTER, J.D., G.M. TOMKINS: Glucocorticoid hormone receptors.
Advances in the Biosciences 7
Pergamon Press Vieweg
Oxford-Edinburgh-New York-Toronto-
Sidney-Braunschweig, 331-344 (1971)
7. BAXTER, J.D., G.G. ROUSSEAU, M.C. BENSON, R.L. GARCEA, J. ITO and G.M. TOMKINS: Role of DNA and specific cytoplasmatic receptors in glucocorticoid action.
Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.) 69,
1892-1896 (1972)
8. BEATO, M., J. HOMOKI, I. LUKÁCS and C.E. SEKERIS:
Increased template activity for RNA synthesis of rat liver nuclei incubated with cortisol "in vitro".
Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 349,
1099-1104 (1968 a)
9. BEATO, M., J. HOMOKI and C.E. SEKERIS: Über den Angriffspunkt des Cortisols im Zellkern.
Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 349,
1239-1240 (1968 b)
10. BEATO, M., J. HOMOKI and C.E. SEKERIS: On the mechanism of hormone action. XII. Uptake of 1,2-³H-Cortisol by isolated rat liver nuclei.
Exp.Cell.Res. 55, 107-117 (1969 a)
11. BEATO, M., D. BIESEWIG, W. BRAENDLE and C.E. SEKERIS:
On the mechanism of hormone action.
XV. Subcellular distribution and binding of (1,2-³H) cortisol in rat liver.
Biochim.Biophys.Acta (Amst.) 192,
494-507 (1969 b)

12. BEATO, M., W. BRAENDLE, D. BIESEWIG, C.E. SEKERIS:
On the mechanism of hormone action.
XVI. Transfer of (1,2-³H) cortisol
from the cytoplasm to the nucleus of
rat liver cells.
Biochim.Biophys.Acta (Amst.) 208,
125-136 (1970)
13. BEATO, M., W. SCHMID, W. BRAENDLE, D. BIESEWIG and
C.E. SEKERIS: Binding of ³H-cortisol
to macromolecular components of rat
liver cells and its relation to the
mechanism of action of corticosteroids.
Advances in Biosciences 7
Pergamon Press Vieweg
Oxford-Edinburgh-New York-Toronto-
Sidney-Braunschweig, 349-363 (1971)
14. BEATO, M., W. SCHMID and C.E. SEKERIS: Two cortisol
binding proteins from rat liver cytosol.
Biochim.Biophys.Acta (Amst.) 263,
764-774 (1972)
15. BÖHM, N., E. SPRENGER: Fluorescence cytophotometry:
A valuable method for the quantitative
determination of nuclear Feulgen DNA.
Histochemie 16, 100-118 (1968)
16. BOLUND, L., Z. DARZYNKIEWICZ and N.R. RINGERTZ: Cell
concentration and the staining pro-
perties of nuclear deoxyribonucleo-
protein.
Exp.Cell Res. 62, 76-89 (1970)

17. BONNER, J.: The template activity of chromatin.
J. Cell comp.Physiol. 66, 77-90 (1965)
18. BONNER, J.: The role of histones in the regulation
of RNA synthesis.
In: Regulation of nucleic acid and
protein biosynthesis.
Ed.: V.V. KONINGSBERGER und L. BOSCH
Elsevier Publishing Comp. Amsterdam-
London-New York (1967), 221-224
19. BUCK, M.D. and P. SCHAUDER: In vivo stimulation of ^{14}C -
amino acid incorporation into nonhistone
proteins in rat liver chromatin induced
by insulin and cortisol.
Biochim.Biophys.Acta (Amst.) 224,
644-646 (1970)
20. CARDELL jr., R.R.: Action of glucocorticoids on rat
liver cells.
J. Cell Biol. 55, 34a (1972)
21. CLARK, J.H. and L.A. PESCH: Effects of cortisone upon
liver enzymes and protein synthesis.
J.Pharmacol.exp.Ther. 117, 202-207
(1956)
22. DAHMUS, M.E. and J. BONNER: Increased template activity
of liver chromatin, a result of hydro-
cortisone administration.
Proc.Nat.Acad.Sci. (Wash.) 54,
1370-1375 (1965)
23. DARZYNKIEWICZ, Z., L. BOLUND and N.R. RINGERTZ: Nucleo-
protein changes and initiation of RNA
synthesis in PHA stimulated lymphocytes.
Exp.Cell Res. 56, 418-424 (1969)

24. DENKHAUS, W. und D. HEIMER: Mikrofluorometrische Bestimmung der "freien DNS-PO₄-Gruppen" im Chromatin nativer Leberzellkerne von jungen und alten Meerschweinchen. Gerontologia (Basel) 16, 1-13 (1970)
25. FEIGELSON, M., P.R. GROSS and P. FEIGELSON: Early effects of cortisone on nucleic acid and protein metabolism of rat liver. Biochim.Biophys.Acta (Amst.) 55, 495-504 (1962)
26. FIALA, E.S. and G. LITWACK: Binding of a (¹⁴C) hydrocortisone metabolite in liver supernatant. Biochim.Biophys.Acta (Amst.) 124, 260-266 (1966)
27. GALLWITZ, D.: Histone methylation. Arch.Biochem.Biophys. 245, 650-657 (1971)
28. GLEDHILL, B.L., M.P. GLEDHILL, R. RIGLER and R.N. RINGERTZ: Changes in deoxyribonucleo-protein during spermiogenesis in the bull. Exp.Cell Res. 41, 652-665 (1966)
29. GOODLAD, G.A.J. and H.N. MUNRO: Diet and the action of cortisone on protein metabolism. Biochem. J. 73, 343-348 (1959)
30. GRAUMANN, W.: Zur Standardisierung des Schiff'schen Reagenz. Z.wiss.Mikr. 61, 225-226 (1953)

31. GREENMAN, D.L., W.D. WICKS and F.T. KENNEY: Stimulation of ribonucleic acid synthesis by steroid hormones.
J.biol.Chem. 240, 4420-4426 (1965)
32. HANOUNE, J. and P. FEIGELSON: Turnover of protein and RNA of liver ribosomal components in normal and cortisoltreated rats.
Biochim.Biophys.Acta (Amst.) 199, 214-223 (1970)
33. HARBERS, E.: Nucleinsäuren.
G. Thieme Verlag Stuttgart 1969
34. HARBERS, E. und W. SANDRITTER: Aufbau und Funktion des Chromatins.
Klin.Wschr. 51, 631-643 (1973)
35. HEIMER, D.: Quantitative Bestimmung der "freien" DNS-PO₄-Gruppen in menschlichen Leberzellkernen in Abhängigkeit vom Lebensalter.
Inaug.Diss. Mainz 1972
36. HEINE, H.: Der Ultrapak.
Z.wiss.Mikr. 48, 450-465 (1931)
37. HNILICA, L.S.: Proteins of the cell nucleus.
In: Progress in nucleic acid research and molecular biology, Vol.7, 25-106
Ed.: J.N. DAVIDSON and W.E. COHN
Academic Press New York, London 1967
38. HUANG, R.C. and J. BONNER: Histone, a suppressor of chromosomal RNA synthesis.
Proc.Nat.Acad.Sci.(Wash.) 48, 1216-1222 (1962)

39. JACOB, F. and J. MONOD: Genetic regulatory mechanism in the synthesis of the protein.
J.molec. Biol. 3, 318-356 (1961)
40. JERVELL, K.F.: Early effects of glucocorticoids on ribonucleic acid and protein metabolism in rat liver.
Acta endocr. (Kbh.) 44, 3-36 (1963)
41. JERVELL, K.F. and J.-B. OSNES: Synthesis of 5-ribosyluracil in the liver of adrenalectomized rats treated with cortisone.
Biochim.Biophys.Acta (Amst.) 91, 166-168 (1968)
42. KAPLOWITZ, P.B., R.D. PLATZ and C.J. KLEINSMITH: Nuclear phospho-proteins. III. Increase in phosphorylation during histone-phosphoprotein interaction.
Biochim.Biophys.Acta (Amst.) 229, 739-748 (1971)
43. KARLSON, P.: Biochemische Wirkung der Hormone.
Dtsch.med.Wschr. 86, 668-674 (1961)
44. KARLSON, P. und C.E. SEKERIS: Wirkungsmechanismus der Steroidhormone.
Dtsch.med.Wschr. 98, 831-835 (1973)
45. KENNEY, F.T. and F.J. KULL: Hydrocortisone-stimulated synthesis of nuclear RNA in enzyme induction.
Proc.Nat. Acad.Sci. (Wash.) 50, 493-499 (1963)

46. KENNEY, F.T., W.D. WICKS and D.L. GREENMAN: Hydrocortisone stimulation of RNA synthesis in induktion of hepatic enzymes.
J. Cell comp. Physiol. 66, 125-136 (1965)
47. KILLANDER, D. and R. RIGLER: Activation of deoxyribonucleoprotein in human leucocytes stimulated by phytohaemagglutinin.
I. Kinetic of the binding of acridine orange to deoxyribonucleoprotein.
Exp.Cell Res. 54, 163-170 (1969)
48. KNIPPERS, R.: Molekulare Genetik
G. Thieme Verlag Stuttgart 1971
49. KÜHNAU, J.: Physiologie und Biochemie der endokrinen Regulationen und Korrelationen.
In: Hdb.allg.Path. Bd. VIII/1, 107 ff. (1971)
50. LANG, N. und C.E. SEKERIS: Einfluß von Cortisol auf den Ribonukleinsäure- und Proteinstoffwechsel in Rattenleber.
Hoppe-Seylers Z. physiol.Chem. 339, 238-248 (1964)
51. LEON, H.A.: Early effects of corticosterone on amino acid incorporation by rat liver system subsequent to its in vivo injection.
Endocrinology 78, 481-486 (1966)
52. LÖHR, J. und D. HEIMER: Zytrophotometrische Untersuchungen über altersabhängige Strukturveränderungen am Nucleoproteinkomplex von Leberzellen.
Gerontologia (Basel)18, 122-130 (1972)

53. LÖHR, J.: Fluoreszenzzytophotometrische Untersuchungen zum Wirkungsprinzip der Hormone Hydrocortison, Oestradiol, Trijodthyronin und Glucagon an Rattenleberzellkernen. Habil. Mainz 1973
54. LÖHR, J., W.E.G. MÜLLER and R. ZAHN: The Influence of Hydrocortisone-Acetate of the Course of the Phenanthrenequinone Reaction During the RNA Synthesis in the Interphase Nuclei from Rat Liver Cells. 10.th. International Congress International Academy of Pathology Post-Congress Symposium "DNA and Pathology" Freiburg/Br. 22.9.1974 a
55. LÖHR, J., W.E.G. MÜLLER: Zur Kinetik der Acridinorange-Reaktion bei der Cortison-induzierten RNA-Biosynthese in der Rattenleber. XVII. Symposion der Gesellschaft für Histochemie. Bozen/Italien 5.10.1974 b
56. LÖHR, J., W.E.G. MÜLLER: Zum Einfluß des Trijodthyronin auf die RNA-Biosynthese in der Rattenleber. Herbsttagung d.Deutschen Gesellschaft für Pathologie. Mainz, 12.10.1974 c
57. LOWE, C.U. and R.N. RAND: Alterations in biochemical composition and ribonucleic acid metabolism induced in rat liver by cortisone. J.biophys.biochem.Cytol.2,331-350 (1956)

58. LOWY, J., T. ALBEPART and J.R. PASQUALINI: ^3H -Cortico-sterone metabolism in the rat.
Acta Endocrinol. (Kbh.) 61, 483-493
(1969)
59. LUKÁCS, I. and C.E. SEKERIS: On the mechanism of hormone action. IX. Stimulation of RNA polymerase activity of rat liver nuclei by cortisone in vitro.
Biochim.Biophys.Acta (Amst.) 134,
85-90 (1967)
60. MAGUN, B.E. and J.W. KELLY: A new fluorescent method with phenanthrenquinone for the histochemical demonstration of arginine residues in tissues.
J.Histochem.Cytochem.17, 821-827 (1969)
61. MONDER, C. and M.C. WALKER: Interactions between corticosteroids and histones.
Biochemistry 9, 2489-2497 (1970)
62. MOREY, K.S. and G. LITWACK: Isolation and properties of cortisol metabolite binding proteins of rat liver cytosol.
Biochemistry 8, 4813-4821 (1969)
63. MÜLLER, D.: Erfahrungen mit der Feulgen-Färbung für quantitative cytochemische DNS-Untersuchungen. Histochemie 7, 96-102 (1966)
64. MÜLLER, W.E.G., J.LÖHR and R.ZAHN: Biochemical and Cytophotometrical Determination of the "Free DNA- PO_4 -Groups" in Interphase Nuclei from Rat Liver during Induction of RNA synthesis by Triiodothyronine.
10.th International Congress.
International Academy of Pathology
Post-Congress Symposium "DNA and Pathology"
Freiburg/Br. 22.9.1974

65. MURTHY, T.A., D.S. PRADHAN and SREENIVASAN: Effects of hydrocortisone upon metabolism of histones in rat liver.
Biochim.Biophys.Acta (Amst.) 199, 500-510 (1970)
66. NOESKE, K.: Die Zusammensetzung der Zellkernproteine und ihre Beziehung zum DNS-Gehalt im Verlauf der normalen Myelo- und Erythropoese beim Menschen.
Habil. Gießen 1968
67. PUPPE-ERDMANN, B.: Mikrofluorometrische Bestimmungen der Acridinorange-Bindungskapazität von Leberparenchym- und Nierentubuluszellkernen in Abhängigkeit vom Lebensalter.
Inaug.Diss. Mainz 1971
68. RIGLER jr., R.: Microfluorometric characterisation of intracellular nucleic acids and nucleoproteins by acridine.
Acta physiol.scand. 67, 1 ff. (1966)
69. RIGLER, R. and D. KILLANDER: Activation of deoxyribonucleoprotein in human leucocytes stimulated by phytohemagglutinin.
II. Structural changes of deoxyribonucleoprotein and synthesis of RNA.
Exp.Cell Res. 54, 171-180 (1969)
70. RIGLER, R., D. KILLANDER, L. BOLUND and N.R. RINGERTZ: Cytochemical characterisation of deoxyribonucleoprotein in individual cell nuclei.
Exp.Cell Res. 55, 215-224 (1969)

71. RINGERTZ, N.R., L. BOLUND and Z. DARZYNKIEWICZ: Acridin-orange binding of intracellular nuclei acids in fixed cells in relation to cell growth.
Exp.Cell Res. 63, 233-240 (1970)
72. SCHILTZ, E. and C.E. SEKERIS: Enzymatic phosphorylation of nuclear proteins by (^{32}P)ATP in isolated rat liver nuclei.
Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 350, 317-328 (1969)
73. SCHMID, W., D. GALLWITZ and C.E. SEKERIS: On the mechanism of hormone action. VIII. Further studies on the effect of cortisol on isolated rat-liver nuclei.
Biochim.Biophys.Acta (Amst.) 134, 80-84 (1967)
74. SCHULTZ, G.: Die Bedeutung von cyclischem AMP bei Hormonwirkungen.
Der Internist 13, 159-166 (1972)
75. SHELTON, K.R. and V.G. ALLFREY: Selective synthesis of a nuclear acidic protein in liver cells stimulated by cortisol.
Nature 228, 132-134 (1970)
76. SLUYSER, M.: Interaction between hormones, histones and deoxyribonucleic acids.
In: Regulation of nucleic acid and protein biosynthesis.
Ed.: V.V. KONINGSBERGER und L. BOSCH
Elsevier Publishing Comp.Amsterdam-London-New York (1967), 225-232

77. SLUYSER, M.: Interaction of steroid hormones with histones in vitro.
Biochim.Biophys.Acta (Amst.) 182,
235-244 (1969)
78. SPRENGER, E., N. BÖHM, M. SCHADEN, W. SANDRITTER: Zur Kinetik der Feulgen-Hydrolyse bei Zellen junger und alter Ratten.
Beitr.Path. Bd. 143, 59-69 (1971)
79. TSAI, Y.-H. and L.S. HNILICA: Interactions of histones with corticosteroid hormones.
Biochim.Biophys.Acta (Amst.) 238,
277-287 (1971)
80. WEBER, G., R.L. SINGHAL, N.B. STAMM and S.K. SRIVASTAVA: Hormonal induction and suppression of liver enzyme biosynthesis.
Fed.Proc. 24, 745-754 (1965)
81. WESTPHAL, U.: Steroid-protein interactions.
In: Monographs on endocrinology.
Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-
New York (1971)
82. WIENER, J., A.V. LOUD, D.V. KIMBERG and D.SPIRO: A quantitative description of cortisone-induced alterations in the ultrastructures of rat liver parenchymal cells.
J.Cell comp.Physiol. 37, 47-61 (1968)
83. YU, F.-L. and P. FEIGELSON: Cortisone stimulation of nucleolar RNA polymerase activity.
Proc.Nat.Acad.Sci.(Wash.) 68, 2177-2180
(1971)

84. ZETTERBERG, A. and G. AUER: Proliferative activity and cytochemical properties of nuclear chromatin related to local cell density of epithelial cells.
Exp. Cell Res. 62, 262-270 (1970)

Lebenslauf

Am 6. Januar 1948 wurde ich, Klaus-Dieter Böhm, als zweites Kind des praktischen Arztes Dr. med. Walter Böhm und seiner Ehefrau Marianne, geb. Greulich, in Meisenheim geboren.

Seit 1949 wohne ich in Engers, wo ich ab Ostern 1954 die Katholische Volksschule besuchte. Ostern 1959 wechselte ich auf das Staatliche Neusprachliche Gymnasium für Jungen in Neuwied über. Das Abitur bestand ich im Sommer 1967 an der gleichen Schule.

Nach dem Wehrdienst konnte ich zum Sommersemester 1969 das Studium der Medizin an der Johannes Gutenberg-Universität aufnehmen. Die Naturwissenschaftliche Vorprüfung absolvierte ich nach 2 Semestern, die Ärztliche Vorprüfung legte ich nach 5 Semestern im Sommer 1971 ab. Das klinische Studium setzte ich an den Kliniken der gleichen Universität fort.

Die ärztliche Prüfung bestand ich am 9. Dezember 1974. Seit 1. Januar 1975 bin ich Medizinal-Assistent am Stadt- und Kreiskrankenhaus Wetzlar.

Herrn Professor Dr. med. J. Löhr bin ich zu großem Dank für die Überlassung des Themas, die gebotenen Arbeitsmöglichkeiten, die hilfreiche Unterstützung bei der Bearbeitung sowie seiner Bereitschaft, diese Arbeit als Dissertation zu befürworten, verpflichtet.

Herrn Professor Dr. Müller habe ich für die Übernahme des Korreferates zu danken.

Herrn Diplom-Mathematiker Mau aus dem Institut für Statistik und Dokumentation der Johannes Gutenberg-Universität Mainz danke ich sehr für seine Hilfe bei der statistischen Bearbeitung dieser Untersuchung.

Chemoprint-Druck 63 Gießen Frankfurter Str. 131 Ruf (06 41) 2 17 12